

SARA ISABEL DA SILVA FARIA

## **Deteção e Caraterização Genotípica do vírus BK: Potencial na Determinação Geográfica Individual**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

**Orientador** – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

**Afiliação** – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto.

**Co-orientador** – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

**Afiliação** – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto.

## **Informação Técnica**

TÍTULO: Detecção e Caraterização genotípica do vírus BK: Potencial na Determinação Geográfica Individual

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

AUTOR: Sara Isabel da Silva Faria

DATA: Outubro de 2016

EDITOR: Sara Isabel da Silva Faria

MORADA: Avenida Paraíso, nº 1101

LOCALIDADE: Delães-Vila Nova de Famalicão

CÓDIGO POSTAL: 4765-634

CORREIO ELETRÓNICO: sara\_faria@live.com.pt

1ª EDIÇÃO: Outubro de 2016

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*(Arthur Schopenhauer)*



## **Agradecimentos**

Na concretização de mais uma jornada, que me conduziu ao Mestrado em Medicina Legal, muito tenho a agradecer a todos aqueles que contribuíram para o meu enriquecimento académico e científico. Assim sendo, a elaboração deste trabalho não seria possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas.

Agradeço antes de mais, à minha orientadora, a Doutora Ana Luísa Teixeira, por fazer do laboratório de Oncologia Molecular e Patologia Viral um local de tantas aprendizagens. Agradeço todo o auxílio, disponibilidade e dedicação que permitiu fortalecer as minhas qualidades e auxiliar na correção dos meus erros, encaminhando me sempre para o caminho mais correto. Aprendi consigo a importância de sermos perseverantes e de não desistirmos mesmo quando tudo parece não resultar.

Ao Doutor Rui Medeiros, com quem tive o privilégio de conviver, pelos ensinamentos e pela sua capacidade de ultrapassar obstáculos e criar novos desafios permanentemente.

Agradeço a todos os colegas do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto, em especial à Doutora Francisca, por toda a paciência, colaboração e por fazerem do laboratório um local de trabalho com um ambiente agradável. Obrigado por transmitirem os vossos conhecimentos que servirão como um exemplo a seguir para uma futura carreira profissional.

Quero agradecer ainda, à Doutora Maria José Pinto da Costa, por permitir que a concretização deste mestrado fosse possível. Obrigada pelo interesse que demonstrou pelo meu percurso académico, pelo meu trabalho e pelo auxílio na resolução de todos os obstáculos que surgiram ao longo destes dois anos.

Agradeço também à minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai, por todo o esforço que fizeram para que a concretização de mais uma etapa fosse possível, acarinhando e apoiando em todas as circunstâncias. Vocês são sem dúvida os verdadeiros impulsionadores desta aventura que é a vida.

Com um carinho muito especial, agradeço ainda, à Doutora Ana Azevedo que se revelou uma amiga única. Obrigada pela incansável ajuda na execução deste trabalho, pela cumplicidade e pela partilha. Obrigada por me fazeres rir nos momentos mais difíceis e por me ajudares a ver as verdadeiras alegrias da vida.

Agradeço também à Isabel Vilar, à Ana Júlia Miranda e à Beatriz por me terem ajudado a ultrapassar obstáculos, por me apoiarem nos momentos mais difíceis sempre com um sorriso e uma palavra amiga.

Ao André Castro, por dividir comigo todas estas experiencias e por me apoiar incondicionalmente em tudo o aquilo que lhe foi possível.

A todos o meu sincero obrigado!

## Abreviaturas

**B**

BKV BK vírus

**C**

**°C**                      Graus Celsius

**CaP**                      Cancro da Próstata

## D

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (em português: ácido desoxirribonucleico)
-----	--

dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
------	----------------------------------

**E**

EUA Estados Unidos da América

## H

HPyV Poliomavírus Humanos

HPyV10 Poliomavírus Humano 10

HPyV6 Poliomavírus Humano 6

HPyV7 Poliomavírus Humano 7

HPyV9 Poliomavírus Humano 9

## 1

ICTV *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
(em português: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IC Intervalo de Confiança

**J**

JCV *John Cunningham Virus*

## K

KIV *Karolinska Institute Virus*

**M**

mL	Mililitros
MCV	<i>Merkel Cell Polyomavirus</i> (em português: Vírus das Células de Merkel)
MPyV	<i>Murine Polyomavirus</i> (em português: Poliomavírus Murilo)
MWPpyV	Poliomavírus Malawi
mRNA	RNA mensageiro

**N**

NCCR	<i>Non-coding Control Region</i> (em português: Região de Controlo Não Codificante)
nm	Nanómetros

**O**

OR	<i>Odds Ratios</i>
----	--------------------

**P**

bp	<i>Base par</i> (em português: Pares de Base)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (em português: Reacção em Cadeia da Polimerase)
%	Porcentagem
PML	<i>Progressive multifocal leukoencephalopathy</i> (em português: leucoencefalopatia multifocal progressiva)

**R**

Rpm	Rotações por Minuto
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

**S**

SV40	<i>Simian Vacuolating vírus 40</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (em português: Polimorfismos de um Único Nucleotídeo)



SNC	Sistema Nervoso Central
<b>T</b>	
t-Ag	Antigénio Tumoral Pequeno
T-Ag	Antigénio Tumoral Grande
TSV	<i>Trichodysplasia Spinulosa associated polyomavirus</i> (em português: Poliomavírus associado à Tricodisplasia Espinulosa Spinulosa)
TBE	<i>Tris/Borate/EDT</i>
<b>U</b>	
UV	Ultra Violeta
U	Unidades
<b>V</b>	
VIH	Vírus Imunodeficiência Humana
<b>Y</b>	
µL	Microlitro
<b>W</b>	
WUV	<i>Washington University Virus</i>



# Índice Geral

## Resumo

## Abstract

<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Identificação Humana	2
1.2 Os Poliomavírus	5
1.2.1 Organização Estrutural e Genómica	8
1.3 O BKV Como Modelo de Estudo	10
1.3.1 Estrutura Viral	11
1.3.2 Ciclo Viral	12
1.3.3 Modos de Transmissão e Manifestações Clínicas	14
1.4 Caracterização Genotípica do BKV: Potencial Médico-Legal	16
<b>2. Objetivos</b>	20
2.1 Objetivo Principal	21
2.2 Objetivos Específicos	21
<b>3. Material e Métodos</b>	23
3.1 População em Estudo	24
3.2 Extração de DNA de Amostras Biológicas de Urina	24
3.3 Detecção de DNA do BKV por <i>Polymerase Chain Reaction</i>	25
3.4 Caracterização genotípica do BKV por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	26
3.5 Comparação de Método de Genotipagem do BKV	30
3.6 Análise Estatística	31
<b>4. Resultados</b>	34
4.1 Detecção do BKV	35
4.2 Caracterização Genotípica do BKV	38
4.3 Comparação de Método de Genotipagem do BKV	39

<b>5. Discussão .....</b>	<b>43</b>
<b>6. Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>48</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>51</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Relação filogenética entre os poliomavírus com base na sequência genómica (adaptado de <i>Johne R.</i> e colaboradores, 2011) [17].	6
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática do genoma do BKV (adaptado de Krumbholz A. e colaboradores, 2009) [18].	12
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática do ciclo viral do BKV. (1) Ligação do vírus ao recetor da célula hospedeira. (2) Vírus é endocitado para o interior do hospedeiro. (3) Vírus é transportado até ao núcleo. (4) Exposição do genoma viral. (5) Expressão dos genes precoces. (6) Síntese das proteínas. (7 e 8) Duplicação do DNA viral e respetiva expressão. (9) Síntese de proteínas tardias. (10) Formação de novos vírus. (11) Libertação dos novos vírus do núcleo para o citoplasma da célula hospedeira. (12) Vírus conduzidos para o espaço extracelular. (13) Completam a infeção lítica. (adaptado de <i>Cole C.</i> e colaboradores, 2001) [74].	14
<b>Figura 4</b> - Gel de Agarose 1,5% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à região amplificada de 327 bp (1 - Marcador molecular de 50 bp; 2 - Controlo negativo; 3 - Controlo positivo para BKV; 4 - Caso positivo para o BKV; 5 a 7 - Casos negativos para o BKV).	26
<b>Figura 5</b> - Gel de Agarose 3% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à digestão pela enzima de restrição Alu I ( <i>Thermo Scientific®</i> ) (1 - Marcador molecular de 50 bp; 2 - Controlo negativo; 3 - Controlo positivo do subtipo I ou II do BKV; 4 e 5 - Indivíduos com o subtipo I ou II do BKV).	28
<b>Figura 6</b> - Gel de Agarose 3% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à digestão pela enzima de restrição Xmn I ( <i>BioLabs®</i> ) (1 - Marcador molecular de 50 bp; 2 - Controlo negativo; 3 - Controlo positivo do subtipo II do BKV; 4 a 6, 8 e 9 - Indivíduos com o subtipo II do BKV; 7 - Indivíduo com subtipo I do BKV).	29
<b>Figura 7</b> - Gel de Agarose 3% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à digestão pela enzima de restrição AVA II ( <i>Thermo Scientific®</i> ) (1 - Marcador molecular	

NZYDNA; 2 - Controlo negativo; 3 - Controlo positivo do subtipo III do BKV; 4 e 5 - Indivíduos com o subtipo III do BKV; 6 - Indivíduo com o subtipo IV do BKV).....29

**Figura 8** - Distribuição da população de indivíduos saudáveis de acordo com o género. 35

**Figura 9** - Distribuição da população em estudo de acordo com a idade (A - População de indivíduos saudáveis; B - População de indivíduos com CaP). .....36

**Figura 10** - Frequência do BKV na população de indivíduos saudáveis e de indivíduos com CaP de Portugal. ....36

**Figura 11** - Frequência dos casos positivos para o BKV na população de indivíduos com CaP de acordo com a idade.....37

**Figura 12** - Distribuição dos diferentes subtipos do BKV na população de doentes com CaP de Portugal. ....39

**Figura 13** - Frequência dos casos positivos e negativos para o BKV na população de indivíduos saudáveis e na população de indivíduos com CaP de Portugal. ....40

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Caraterização genotípica dos diferentes subtipos do BKV da posição 1716 à posição 1869 bp (adaptado de <i>Agostini H.</i> e colaboradores, 1995; <i>Tremolada S.</i> e colaboradores, 2010 e <i>Jin L.</i> , 1993) [29, 86, 95]. .....	18
<b>Tabela 2</b> - Enzimas restrição e respetivo tamanho dos fragmentos com a correspondência ao subtipo do BKV (adaptado de <i>Jin L.</i> , 1993) [86]. .....	27
<b>Tabela 3</b> - Enzimas restrição e respetivo tamanho dos fragmentos com a correspondência ao subtipo o BKV (Adaptado de <i>Kaydani G.</i> e colaboradores, 2015) [9]. .....	31
<b>Tabela 4</b> - Frequência do BKV nos grupos de indivíduos em estudo, indivíduos saudáveis e indivíduos com CaP, num estudo de caso controle.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
<b>Tabela 5</b> - Distribuição dos casos positivos, negativos e não conclusivo para a deteção do BKV para cada método utilizado no presente estudo. ....	40
<b>Tabela 6</b> - Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos dos dois métodos aplicados no estudo. ....	41







## **Resumo**



A identificação humana é um dos parâmetros de maior relevância no âmbito médico-legal, tanto por razões legais como por razões humanitárias. Atualmente muitos são os progressos dos métodos de identificação utilizados, no entanto, a maioria baseia-se na comparação de registos *ante-mortem* com registos *post-mortem*, que muitas vezes são inexistentes. Assim sendo, os estudos de poliomavírus humanos, surgem como uma importante descoberta, uma vez que, estes vírus podem permitir o acesso a importantes informações sobre a origem geográfica de cadáveres não identificados.

O vírus BK (BKV) é um dos mais importantes membros da família *Poliomaviridae*, uma vez que o ser humano é o seu único hospedeiro natural distribuindo-se por diversas populações em todo mundo. A infeção primária ocorre na infância permanecendo o vírus latente ou com uma baixa taxa de expressão, sobretudo nos tecidos renais, ao longo da vida do hospedeiro. O vírus é excretado do hospedeiro através da urina, sendo a taxa de excreção significativamente maior em indivíduos imunossuprimidos. Este vírus caracteriza-se por ter um genoma pequeno, com aproximadamente 5100 bp, de cadeia dupla circular, protegido por uma cápside que é constituída por três proteínas virais, a VP1, a VP2 e a VP3. A principal proteína da cápside, a VP1, apresenta variabilidade genómica o que nos permite identificar os diferentes subtipos do BKV, os subtipos I, II, III e IV, que se distribuem de forma desigual por todo o mundo. Estas características genotípicas do BKV são consideradas úteis para a determinação da origem geográfica de cadáveres não identificados, uma vez que, cada região geográfica possui um padrão característico de distribuição genotípica deste vírus, podendo assim delimitar a área de investigação na procura da identidade.

O presente estudo teve por objetivo a deteção do BKV, por técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), em 242 amostras de urina (87 indivíduos saudáveis vs 155 indivíduos com cancro da próstata (CaP), de indivíduos portugueses e sua caracterização genotípica, por técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

O BKV foi detetados em 4,6% dos indivíduos saudáveis e em 28,4% dos indivíduos com CaP, tendo sido verificado o maior número de casos positivos nos indivíduos com idades iguais ou superiores a 51 anos, na população saudável, e nos indivíduos com idades entre 61-80 anos, na população de indivíduos com CaP. Relativamente à caracterização genotípica, os subtipos identificados na população de indivíduos saudáveis foram os subtipos III, I e II. Em relação à população de indivíduos com cancro da próstata foram identificados os subtipos II (72,7%), I (18,2%), III (6,8%) e IV (2,3%). Este padrão de distribuição dos subtipos do BKV em Portugal não se revelou concordante comparativamente com outros estudos o que poderá ser consequência do baixo número

de indivíduos analisados ou poderá revelar um padrão epidemiológico de infecção por BKV diferente, sugerindo a ocorrência de diferentes padrões na Europa associados às diferentes dispersões das populações.

Este estudo suportou a utilização do BKV como um novo marcador molecular, usado no futuro como uma ferramenta adicional na investigação forense, nomeadamente no estabelecimento da origem geográfica de cadáveres ou restos cadavéricos não identificados. Adicionalmente, o BKV também se revelou um possível marcador de patologia, nomeadamente doença oncológica, o que poderá adicionar mais dados informativos em complexos casos de identificação. O seu elevado potencial de aplicabilidade em medicina legal, aliado à utilização de amostras biológicas de fácil colheita e a técnicas de biologia molecular de elevada sensibilidade e especificidade, tornam a aplicação da genotipagem do BKV promissora e exequível no âmbito forense.



## **Abstract**



Human identification is one of the most relevant parameters in the medical legal field, not only for legal , but also for humanitarian reasons. Currently, great progress has been made on the identification methods used. However, the majority is based on the comparison of ante-mortem with post-mortem records, which are often non-existent. Therefore, studies of human polyomavirus emerge as an important discovery, since these viruses can give access to important information regarding the geographical origin of unidentified bodies.

The BK virus (BKV) is one of the most important members of the family *Poliomaviridae*, since the human being is its only natural host, and is distributed by different populations worldwide. The primary infection occurs in early childhood and the virus remains latent or with a low expression rate, especially in the renal tissues, throughout the life of the host. The virus is excreted through the urine of the host, being significantly higher the excretion rate in immunosuppressed individuals. This virus is characterized by having a small genome, with approximately 5100 bp, circular double-stranded, protected by a capsid which consists of three viral proteins VP1, VP2 and VP3. The main capsid protein, VP1, presents genomic variability allowing us to identify different subtypes of BKV - subtypes I, II, III and IV - which are distributed unevenly throughout the world. These genotype characteristics of BKV are considered useful for determining the geographical origin of unidentified bodies, since each geographic region has a characteristic genotype distribution pattern of the virus, which may define the research area in the search for the individuals' identity.

The aim of the present was the detection of the BKV virus using PCR (*Polymerase Chain Reaction*) in 242 urine samples (87 healthy individuals vs 155 individuals with prostate cancer (CaP)), of Portuguese individuals and their genotype characterization using RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

The BKV was detected in 4.6% of healthy individuals and in 28.4% in individuals with CaP, being the largest number of positive cases detected in individuals with age greater than or equal to 51 years, in the healthy population, and in individuals aged between 61-80 years, in individuals with CaP. Concerning the genotype characterization, the subtypes identified in the population of healthy individuals were subtypes III, I and II. In relation to the population of individuals with CaP subtypes II (72.7%), I (18,2%), III (6.8%) and IV (2.3%) were identified. This pattern of BKV subtypes distribution in Portugal hasn't proven consistent compared to other studies, which may be a result of the low number of individuals analyzed or may reveal an epidemiological pattern of infection by different BKV, suggesting the occurrence of different standards in Europe associated to the different dispersions of the population.

This study supported the use of the BKV as a new molecular marker that can be used as an additional tool in forensic investigation, namely in the establishment of the geographical origin of unidentified cadavers or cadaveric remains. Additionally, our finding revealed that BKV could also be used as potential disease marker, in particular in oncological disease, which can add more informative data in complex identification cases. Its high potential applicability in forensic medicine, combined with the use of biological samples of easy collection and molecular biology techniques of high sensitivity and specificity, make the application of genotyping of BKV promising and feasible BKV in the forensic context.





## **1. Introdução**



## 1.1 Identificação Humana

A identificação humana *post-mortem* constitui um dos principais e mais importantes desafios no âmbito médico-legal e muitos são os métodos de identificação utilizados [1, 2]. Estes métodos de identificação dizem respeito a um conjunto de procedimentos e técnicas executadas por um vasto número de especialistas, que tem como objetivo chegar a uma identificação fidedigna de um indivíduo [1, 2]. Os quatro principais indicadores que caracterizam a identidade biológica de um indivíduo são o género, a idade, a estatura e a origem étnica [3].

Na maioria das vezes, o reconhecimento formal do cadáver é realizado por familiares e/ou amigos que são considerados "responsáveis" pelo cadáver, no entanto, tal identificação só é possível quando existe uma boa conservação cadavérica [4]. Contudo, o cadáver pode surgir nas mais variadas condições de preservação, que vão desde a perfeita conservação cadavérica, à esqueletização completa, não sendo neste caso o reconhecimento visual o método de identificação mais viável [4]. Deste modo, podemos admitir que a identificação cadavérica, não se trata de um procedimento simples, pelo que o uso de outros métodos de identificação devem ser usados de forma adequada com o intuito de obter uma identificação credível [1, 2].

Atualmente, as principais áreas envolvidas na identificação cadavérica são: a datiloscopia, a odontologia, a antropologia e a biologia forense [4].

A datiloscopia, mais concretamente a análise lofoscópica, é uma técnica que se baseia no estudo das impressões digitais, nomeadamente das cristas dermopapilares e dos pontos característicos formados nestas, os quais são característicos de cada indivíduo [2, 4]. Contudo, a limitação deste método de identificação surge quando as impressões digitais ficam comprometidas pelos processos putrefativo e/ou de decomposição ou por fatores *post-mortem*, tais como a temperatura, fenómenos ambientais e/ou desidratação, de tal maneira que provocam alterações irreversíveis o que torna impossível a sua aplicação [2, 4].

A odontologia é uma outra metodologia que se baseia essencialmente na análise e deteção de particularidades da arcada dentária, em particular nos detalhes dos dentes [4, 5]. Os dentes são extremamente resistentes à decomposição, aos fatores ambientais e, de um modo geral, aos fatores *post-mortem* [4, 5]. Estes detalhes são elementos cruciais para a identificação, principalmente nos casos em que os tecidos moles já não existem [4, 5]. Devido às possíveis variações de forma, tamanho e posição, estes constitui um aparelho tridimensional que é característico de cada indivíduo [4, 5]. A genética individual, a dieta nutricional, os fatores ambientais e patológicos e os tratamentos dentários reduzem a

possibilidade de dois conjuntos de dentes poderem ser idênticos, e, assim, permitir uma identificação odontológico mais coerente e precisa [4, 5]. Ainda assim, para a análise odontológica ser possível os registos *ante-* e *post-mortem* têm de ser colocados lado a lado e, dente após dente, consistências e inconsistências são investigadas [4, 5]. A ausência destes registos constitui a principal desvantagem deste tipo de análise, o que ocorre com elevada frequência, principalmente no que diz respeito aos registos *ante-mortem* [4, 5].

Tal como a odontologia forense a antropologia recorre, também, à comparação entre radiografias *ante-* e *post-mortem* de diversas partes que constituem o esqueleto para estabelecer a identificação dado que, cada osso apresenta particularidades morfológicas que são variáveis de indivíduo para indivíduo [4]. A dificuldade na análise surge na determinação de quais e quantos elementos morfológicos são necessários e suficientes para uma identificação e mais uma vez de registos prévios que na maioria das vezes estão ausentes [4].

A biologia forense é um outro método de identificação que se baseia na genotipagem do ácido desoxirribonucleico (DNA: *deoxyribonucleic acid*) humano, ou seja, da identificação de regiões do DNA que individualizam e caracterizam cada indivíduo [4]. Estas técnicas dependem da execução de um etapa primordial, que diz respeito à extração de DNA a partir de amostras biológicas do cadáver a identificar, no entanto, as condições e as circunstâncias em que o cadáver foi encontrado podem ser um obstáculo [4]. Esta metodologia é definida como uma das mais dispendiosas e que requer maior tempo de execução [4].

Está descrito que características específicas de cada indivíduo, tais como cicatrizes, manchas e anomalias anatómicas podem auxiliar na identificação, no entanto, são usados como complemento de outros métodos e não como uma técnica isolada de identificação [4]. Assim, a identificação é obtida, na maioria das vezes, pela associação de um conjunto de técnicas onde todas elas apontam para uma determinada identificação individual [4].

A análise das impressões digitais (datiloscopia), a biologia forense e a odontologia forense são, atualmente, os métodos mais utilizados para a identificação humana [6, 7]. A grande limitação destas metodologias, e das anteriormente descritas, é que em todas elas a análise baseia-se na comparação entre dados e/ou registos obtidos *post-mortem* com dados e/ou registos *ante-mortem*, ou seja registos de referência, os quais são inexistentes na maioria dos casos [4]. Deste modo, o desenvolvimento de um método que reduza rapidamente as possíveis identidades dos cadáveres não identificados, fornecendo informações geográficas, que delimitam a área de investigação seria extremamente valioso e daria um importante auxílio na procura da identidade pelas entidades responsáveis pela investigação.

Recentemente, tem sido descrito como um método útil na identificação individual o estudo da variabilidade do BKV, com o objetivo de determinar a origem geográfica dos portadores deste vírus [6]. Assim, em casos em que o cadáver não foi identificado e é possível a colheita de amostra biológica de urina, e nesta for detetada a presença do BKV, podem ser realizados alinhamentos de sequências genéticas do DNA viral, ou seja, definir o genótipo do vírus existente e consequentemente realizar a associação em termos geográficos, dado que já foram identificados diversos genótipos em diferentes regiões mundiais [6, 7]. Este marcador permite portanto delimitar a área a ser investigada na procura da identidade [8].

A excreção do DNA viral do BKV ocorre através da urina dado que os locais de permanência e latência dos vírus são os tecidos renais e urinários [9-13]. A urina é uma amostra biológica por excelência para a investigação do BKV, uma vez que nesta amostra biológica a concentração de carga viral é significativamente superior o que a caracteriza como uma amostra de qualidade estando também acessível a colheita para auxiliar na investigação da identidade humana [14].

Uma outra vantagem do uso deste marcador biológico é o fato de não se alterar após um longo intervalo *post-mortem*, ou seja, o vírus foi eficientemente detetado até 72 horas após a morte, sendo portanto estável às alterações *post-mortem* [6].

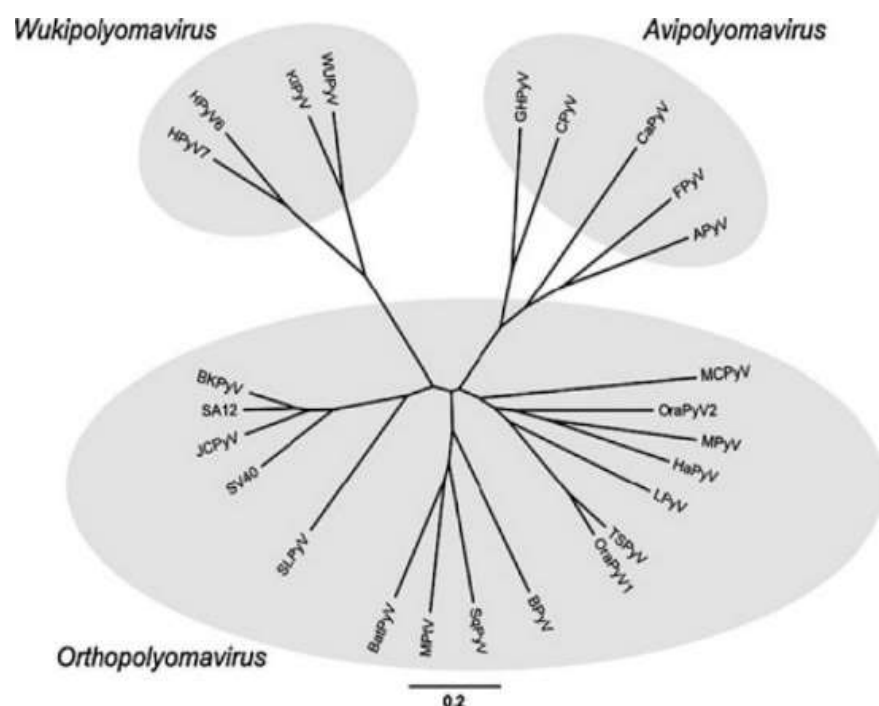
A genotipagem do BKV é portanto uma técnica simples e eficiente para inferir a origem geográfica de um indivíduo e assim auxiliar na delimitação da área de investigação para a obtenção da identificação podendo ainda contribuir para a determinação do padrão de distribuição geográfico nas populações [6].

## 1.2 Os Poliomavírus

Durante décadas, o BKV foi considerado membro da família *Papovaviridae*, cujo nome deriva do papolomavírus de coelho (pa), do poliomavírus de murino (po) e do *Simian Vacuolating* vírus 40 (SV40) (va) [15]. Contudo, esta família foi posteriormente subdividida em duas famílias distintas: a *Papillomaviridae* e a *Poliomaviridae* [15]. Esta subdivisão surgiu fundamentalmente devido às diferenças significativas que os vírus apresentavam entre si, diferenças essas que são relativas ao tamanho e à estrutura genómica dos vírus [16]. No entanto, os mecanismos usado para a transcrição genética e replicação viral, são extremamente semelhantes permitindo afirmar que os *Papillomavirus* e *Poliomavírus* evoluíram de um progenitor viral comum [16]. Relativamente às diferenças encontradas entre estas famílias sabe-se que os vírus pertencentes à família *Papillomavírus* são ligeiramente maiores, têm 55 nanómetros (nm) de diâmetro e um genoma de cadeia simples com aproximadamente 8000 pares de bases (*base par*: bp) de tamanho [16]. Já os *Poliomavírus* têm 45 nm de diâmetro e um genoma de cadeia dupla com aproximadamente 5200 bp [16]. Ambos os vírus pertencentes a estas famílias causam infecção em hospedeiros imunocompetentes e imunossuprimidos e têm também sido associados a patologia oncológica [16].

A família *Poliomaviridae*, após a subdivisão, era constituída por um único género, o *Poliomavírus* onde o BKV foi considerado membro dadas as suas características estruturais e genómicas [15]. Em 2010, o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV: *International Committee on Taxonomy of Virus*), recomendou várias revisões taxonómicas, e propôs que a família *Poliomaviridae*, que era constituída apenas por um único género, passasse a incluir três novos géneros distintos, dois géneros contendo vírus que infetam mamíferos e um género contendo um vírus que infeta aves [15, 17]. Os dois géneros que infetam mamíferos são designados de *Orthopolyomavirus* e *Wukipolyomavirus*, e o género que infeta aves foi designado por *Avipolyomavirus* (Figura 1) [17]. O género *Orthopolyomavirus* inclui os vírus JC, BK, SV40 entre outros e o género *Wukipolyomavirus* inclui os novos vírus: *Washington University Virus* (WUPyV), *Karolinska Institute Virus* (KIPyV), poliomavírus humano 6 (HPyV6) e poliomavírus humano 7 (HPyV7) [17].

Os critérios utilizados na criação dos novos taxa incluem: as características biológicas, o tipo de hospedeiro, a capacidade de transformação oncogénica, os sintomas da infeção primária e a estrutura genómica dos vírus [17].



**Figura 1** - Relação filogenética entre os poliomavírus com base na sequência genômica (adaptado de *Johne R.* e colaboradores, 2011) [17].

O poliomavírus de rato (MPyV), atualmente conhecido como Poliomavírus Murino, foi o primeiro poliomavírus identificado, sendo descrito pela primeira vez pelo *Gross L.*, em 1953, enquanto estudava leucemia induzida em ratos recém-nascidos [18-22]. *Gross L.* observou que alguns animais inoculados com um retrovírus desenvolviam adenocarcinomas na glândula parótida, sendo que extratos destes tumores continham um vírus que provocava a formação de múltiplos tumores sólidos, em ratos recém-nascido [19, 20, 22]. Deste modo, e devido a essa característica, o vírus foi designado como "poli"-muitos e "oma"-tumores [19-22]. No final da década de 1950, *Stewart S.* e *Eddy B.*, deram seguimento ao estudo de *Gross L.* e comprovaram as suas primeiras observações [19, 23, 24].

Posteriormente, em 1960, foi reportado pela primeira vez o vírus SV40 como um contaminante das vacinas da poliomielite [25]. Desde a descoberta destes vírus, o SV40 e o MPyV, que ambos têm sido usados como modelos de investigação da replicação viral dos restantes membros desta família [25]. Assim, o aparecimento do vírus SV40 melhorou significativamente o conhecimento da biologia e da genética dos poliomavírus [18]. Este vírus foi também o primeiro vírus cujo genoma foi clonado e completamente sequenciado [18].

Os primeiros relatos dos poliomavírus humanos, BKV e JCV, foram registados em 1971 [6, 19]. O BKV foi cultivado por *Gardner S.* e colaboradores a partir de amostras de urina de um recetor de um transplante renal, que desenvolveu estenose ureteral, ao passo que JCV foi isolado por *Padgett B.* e colaboradores a partir de um doente imunossuprimido que apresentava leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML: *progressive multifocal leukoencephalopathy*); os nomes de ambos os vírus derivam das iniciais do respetivo doente de onde foram isolados pela primeira vez [18-20, 26, 27]. Estes vírus são ubíquos e amplamente difundido por toda a população humana, sendo os mais comumente encontrados, e sabe-se que exibem uma organização genómica muito semelhante entre si, ou seja, possuem cerca de 75% de similaridade [27-31]. Relativamente à transmissão sabe-se que no BKV ocorre geralmente mais cedo do que no JCV; a excreção do vírus na população saudável é muito menor no caso do BKV do que no caso do JCV [32, 33].

Em 2007, foram isolados mais três membros desta família: o *Karolinska Institute Polyomavirus* (KIV) e o *Washington University Virus* (WUV) que são definidos como agentes infecciosos de humanos apresentando ambos tropismo para as células do trato respiratório [20, 34]. Posteriormente, em 2008 foi identificado o *Merkel Cell Polyomavirus* (MCV) em células do carcinoma de Merkel, que é um cancro de pele raro e muito agressivo [35]. Nos anos subsequentes, o número de poliomavírus aumentou substancialmente devido ao desenvolvimento de uma larga escala de técnicas de rastreio molecular e já têm sido descritos poliomavírus de ruminantes e de mamíferos marinhos [15, 16, 36-39]. Assim sendo, em 2010 foi detetado o poliomavírus humano 6 (HPyV6), o poliomavírus humano 7 (HPyV7) e o poliomavírus associado à Tricodisplasia Espinulosa (TSV) [30, 40-42]. Este último foi isolado a partir de uma amostra de pele de um doente imunossuprimido com Tricodisplasia Espinosa causada pelo TSV [30, 42].

O poliomavírus humano 9 (HPyV9) foi identificado em 2011, a partir de uma amostra de sangue de um doente que tinha realizado um transplante renal [42]. Já em 2012, foi identificado o poliomavírus *Malawi* (MWPyV), numa amostra biológica de fezes de uma criança saudável, e o poliomavírus humano 10 (HPyV10), foi identificado a partir da amostra biológica de pele de um doente portador de doença genética rara [38, 42, 43].

Apesar de estes vírus serem semelhantes em muitos aspetos, tais como no padrão de transcrição e nas funções das proteínas, o que nos permite inseri-los no mesmo género, exibem comportamentos biológicos e patogénese distintos uma vez que infetam uma grande variedade de espécies [32, 44]. Estas diferenças contribuem para a biologia única de cada vírus da família *Poliomaviridae* [28].

Os poliomavírus são ubíquos na população e comuns na população adulta, e sabe-se que 80% da população demonstram evidências de exposição passada a estes vírus [15,



16, 36, 37, 44]. Um estudo realizado por *Rodrigues C.* e colaboradores em 2007, demonstrou que a excreção de poliomavírus na urina de indivíduos saudáveis é altamente variável entre os homens e as mulheres, e é influenciada pela idade, ou seja, sabe-se que a frequência da excreção do BKV na urina é superior em indivíduos mais velhos que em indivíduos mais novos [45]. Estes, permanecem geralmente latentes ou com um baixo nível de expressão nos rins, no sistema nervoso central e/ou no sistema hematopoiético, provocando alterações no sistema nervoso central, no trato urinário, infecções da pele e do trato respiratório em indivíduos imunossuprimidos [6, 18, 30, 46]. Dada a característica de latência destes vírus, os doentes submetidos a transplante e consequentemente num estado de imunossupressão, apresentam um maior risco de reativação viral [15, 16, 36, 37, 44]. Esta reativação pode causar disfunção e levar a perda precoce do órgão transplantado [15, 16, 36, 37, 44].

Atualmente, pensa-se que os poliomavírus humanos possam estar associados ao desenvolvimento de cancro, no entanto, o seu papel como agente causal ou como um cofator permanece por esclarecer [20, 47, 48]. Evidências obtidas experimentalmente mostram que tanto JCV como o BKV são capazes de induzir tumores em uma grande variedade de animais de laboratório e em humanos, em particular no cérebro, no entanto não são elementos suficientes para serem a causa direta para a ocorrência desses tumores; fatores adicionais e/ou alterações genéticas podem ser necessários para a sua ocorrência [44, 49-53]. O BKV pode estar associado a carcinomas da bexiga, do rim, e da próstata uma vez que, como já foi referido, o seu principal local de latência é o trato urinário [49].

### **1.2.1 Organização Estrutural e Genómica**

Os Poliomavírus são vírus pequenos, com aproximadamente 40,5-44,0 nm de diâmetro, sem envelope, com um DNA de cadeia dupla circular [14, 20, 36]. O facto de não possuírem envelope faz com que tenham uma elevada resistência a solventes presentes no meio onde circulam [14, 20, 36].

O genoma dos poliomavírus é constituído por aproximadamente 5000 bp, protegido por uma cápside, com simetria icosaédrica, geralmente do mesmo tamanho em todos os poliomavírus, formada por de três proteínas virais, a VP1, a VP2 e a VP3, que derivam de um precursor comum [19, 36].

Com base no estudo das proteínas que constituem a cápside, podemos afirmar que o SV40, o BKV e JCV contêm 360 moléculas VP1 organizadas em 72 subunidades

pentaméricas que interagem com a cadeia c-terminal de uma das proteínas menos abundantes da cápside, a VP2 ou a VP3 [44]. A formação deste complexo permite que, após a saída dos vírus recém formados do núcleo, possa ser concluída a montagem viral [16]. A VP1 é a principal proteína da cápside e é responsável por mais de 70% da massa viral [16]. Esta proteína auxilia a entrada do vírus na célula hospedeira pela interação com os recetores dessa mesma célula [16].

O genoma dos poliomavírus humanos é dividido funcionalmente em três regiões distintas: uma região de controlo não codificante (NCCR: *Non-coding Control Region*), que contém os promotores virais, a origem da replicação, a *TATA Box*, os locais de ligação de antígenos e os fatores de transcrição de genes precoces e tardios; uma região codificante precoce e uma região codificante tardia [20, 44].

A região codificante precoce é a primeira região do genoma a ser transcrita e codifica o antígeno tumoral grande (T-Ag) e o antígeno tumoral pequeno (t-ag), sendo que o T-Ag é o primeiro a ser expresso [20]. A transcrição desta região ocorre mesmo antes da replicação do DNA viral [20].

O T-Ag é uma fosfoproteína nuclear não estrutural com uma importante função na replicação e na transcrição do DNA viral [20, 44, 54]. Este antígeno é também utilizado como um agente controlador da transcrição dos genes precoces e tardios em conjunto com a *DNA polimerase*, uma vez que, forma um complexo que se liga à origem da replicação do DNA viral e age como uma helicase, ou seja abre e desenrola o DNA para se iniciar a transcrição das regiões tardias [16, 20, 44, 54]. Este antígeno auxilia também na condução do vírus para a célula hospedeira induzindo o ciclo celular desta para a fase S evitando que ocorra a repressão do seu ciclo celular [20, 44].

A função do t-ag no ciclo dos poliomavírus, ainda não se encontra totalmente esclarecida, porém, sabe-se que auxilia o T-ag na progressão do ciclo celular, na indução da fase S do ciclo celular da célula hospedeira e que regula a produção de RNA mensageiro (mRNA) precoce, através da interação com fatores celulares [16, 20, 44, 54]. Tanto a transcrição da região viral precoce como a tardia são mediados pela *DNA polimerase* da célula [16].

A região codificante tardia é expressa mais tarde, durante o ciclo de vida viral, e codifica as proteínas da cápside, VP1, VP2 e VP3 [20, 54].

Nos vírus SV40, BKV e JCV a região tardia também codifica um péptido com aproximadamente sete aminoácidos de comprimento, designado por agnoproteína, não estrutural, que está envolvido na montagem dos vírus recém formados, na sua saída da célula hospedeira bem como na regulação da transcrição [20].

O genoma dos vírus desta família também codifica um antígeno T auxiliar que deriva de um *splicing* alternativo do transcrito T-ag, também conhecido como T-ag truncado, que auxilia todos os processos envolvidos na replicação e transcrição do vírus [54].

O SV40 expressa ainda uma quarta proteína, a VP4, que está envolvida na libertação de partículas de vírus [20]. Estudos recentes afirmam que esta proteína está também presente nos vírus JCV e BKV, mas parece ausente em KIPyV, WUPyV MCPyV; no entanto este facto continua por esclarecer [20].

Os vírus desta família são modelos adequados para diversos estudos em biologia molecular dado que o seu genoma é de pequeno tamanho [36]. Tal fundamento fez com que, os vírus pertencentes a esta família, estivessem entre os primeiros genomas de DNA a serem sequenciados na década de 1970 [36].

### **1.3 O BKV Como Modelo de Estudo**

O BKV é membro da família *Poliomaviridae* e pertence ao género *Orthopolyomavirus* [10, 11, 55, 56]. O vírus foi inserido na família *Poliomaviridae*, uma vez que, o tamanho da partícula viral, a simetria icosaédrica e a estrutura do genoma, se enquadram nas características dos vírus que pertencem a esta família [26, 36].

Diversos estudos, demonstraram que o BKV é estável e que o ser humano é o único hospedeiro natural, estando amplamente distribuído e presente em cerca de 35-90% da população mundial com a exceção de comunidades muito isoladas [9, 13, 16, 45, 57-61]. Apesar da taxa de prevalência ser bastante variável entre as diferentes populações mundiais sabe-se que são encontradas em elevada frequência na Europa, América do Norte e do Sul, Irão, Austrália, África e Pacífico Sul [45].

A infecção primária ocorre, geralmente na infância, até aos 10 anos, com uma maior taxa de incidência, cerca de 90%, em crianças entre os 5 e 9 anos surgindo também em 90% dos adultos [9-13, 51, 59, 62, 63]. Após o primeiro contacto o vírus permanece latente ou com uma baixa taxa de expressão ao longo de toda a vida do hospedeiro não sendo portanto uma ameaça clínica para o doente até se tornar ativo, isso ocorre quando surge por exemplo uma situação de imunossupressão [9, 16, 55, 64, 65]. Esta estratégia biológica é entendida como um comportamento normal para que os vírus de genoma pequeno se mantenham na célula hospedeira sem que sejam eliminados [18, 65].

Os sintomas causados pela infecção viral primária são escassos ou até mesmo inexistentes, tornando a sua deteção uma tarefa difícil, no entanto, quando existem podem

ser acompanhadas por alterações respiratórias e alterações do trato urinário leves em crianças e em adultos [9, 11, 13, 16, 45, 57]. Contudo, quando o sistema Imunitário fica comprometido devido a uma gravidez, um transplante, ao envelhecimento, ao aparecimento de diabetes e de doentes portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou até mesmo a uma imunossupressão provocada por fármacos, o organismo humano readapta-se à sua nova condição, podendo surgir uma reativação viral [9, 16, 47, 55, 64, 66, 67]. Relativamente à gravidez sabe-se que o aumento dos níveis de estrogénios é um dos principais fatores responsáveis pela reativação viral [44].

O BKV permanece preferencialmente no revestimento dos dutos coletores, no epitélio de transição dos cálices renais, no epitélio parietal da cápsula de Bowman e no epitélio de transição da pélvis renal e do trato urinário daí a urina ser a amostra de referência para estudos relacionados com este vírus [36, 44]. O BKV já foi detetado com elevada frequência em tecidos e fluidos urogenitais, incluindo colo do útero, da vulva, da próstata, e no sémen, e em uma frequência relativamente baixa em tecidos cerebrais [68]. A excreção do BKV é também claramente controlada pela resposta imune, uma vez que, é significativamente superior nos indivíduos imunossuprimidos comparativamente com os indivíduos saudáveis [32, 69].

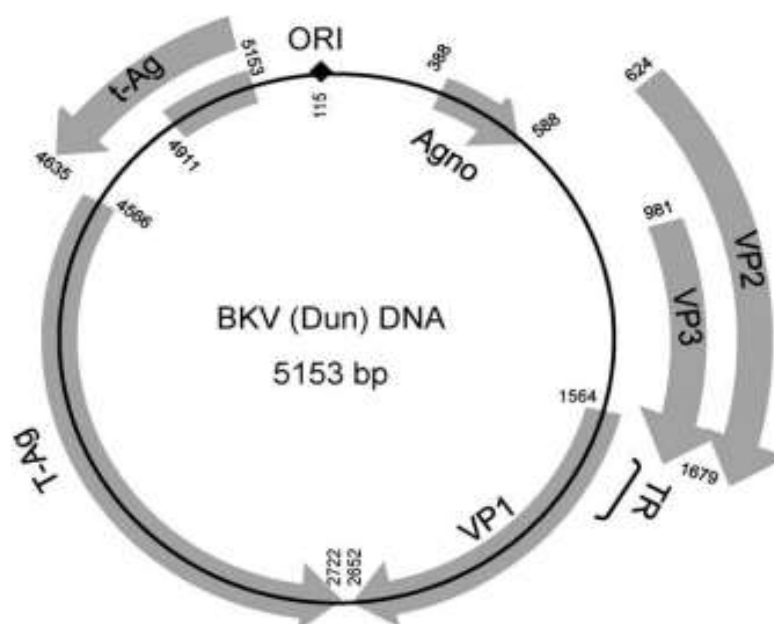
Estudos atuais, que caracterizaram genotipicamente o BKV, propuseram através da avaliação filogenética, realizada ao genoma codificante da proteína principal da cápside, a VP1, a ocorrência de quatro principais subtipos deste vírus: I, II, III, IV [9, 70].

### **1.3.1 Estrutura Viral**

O BKV é um vírus de DNA pequeno, com cerca de 40-44 nm de diâmetro, não apresenta envelope, no entanto, possui cápside com simetria icosaédrica contendo no interior DNA de cadeia dupla circular com aproximadamente 5100 bp na qual a sua informação genética está codificada [10, 11, 26, 45, 55, 71]. O genoma do BKV codifica, entre muitos outros componentes, as proteínas da cápside, proteínas VP1, VP2 e VP3 e dois polipeptídeos não estruturais; T-ag e t-ag que auxiliam no processo infeccioso [71, 72].

As três proteínas da cápside, a VP1, a VP2 e a VP3, envolvem uma única molécula de DNA viral complexado com histonas, H2A, H2B, H3 e H4, na forma de cromatina [36]. O complexo DNA viral-histonas é muitas vezes designado como minicromossoma viral e assemelha-se estruturalmente à cromatina celular do hospedeiro [36]. Estas proteínas dispõem-se de modo a formar uma cápside com simetria icosaédrica contendo 360 moléculas da proteína principal da cápside, VP1, organizada em 71 pentâmeros [36]. Uma

vez que o vírus não possui envelope as partículas virais são resistentes aos solventes da célula hospedeira facilitando a sua entrada [36, 39]. O genoma do BKV divide-se funcionalmente em três regiões distintas: uma região codificante precoce que codifica t-ag e T-ag, uma região codificante tardia que codifica as proteínas estruturais, as VP1, VP2 e VP3, e a região NCCR que contém os promotores e a origem da replicação estando envolvida na regulação da replicação do DNA viral e a sua transcrição (Figura 2) [10, 11, 51, 55].



**Figura 2 -**

Representação esquemática do genoma do BKV (adaptado de *Krumbholz A.* e colaboradores, 2009) [18].

### 1.3.2 Ciclo Viral

O ciclo viral do BKV inicia-se pela adsorção do vírus à superfície celular da célula hospedeira [44]. A adsorção ocorre pela ligação da proteína principal da cápside, a VP1, aos ácidos siálicos que estão associados a glicoproteínas ou a gangliosídeos presentes na membrana celular do hospedeiro [73]. Este componente funciona então como um recetor do vírus na célula hospedeira sendo o principal responsável pela ocorrência da infeção viral [20, 44].

Após se estabelecer esta ligação, e de uma forma semelhante a outros vírus de DNA, o BKV, penetra no citoplasma da célula hospedeira por endocitose mediada por recetores [32, 44]. O processo de entrada do BKV é relativamente mais lento em comparação com os restantes poliomavírus, uma vez que, é sensível à inibição provocada por enzimas e requer valores específicos de colesterol na membrana [44]. Logo após a entrada na célula hospedeira o vírus direciona-se para o retículo endoplasmático [73, 74]. Posteriormente, no retículo endoplasmático e devido a um processo de acidificação que ocorre nos endossomas, o BKV perde o seu revestimento [73]. Ocorre a clivagem da proteína VP1 e a exposição das restantes proteínas da cápside, a VP2 e a VP3, e consequentemente do DNA viral [73]. Estas duas proteínas virais interagem com as importinas, presentes na membrana nuclear, permitindo a entrada do DNA viral no núcleo da célula hospedeira [73]. O vírus usa a maquinaria da célula hospedeira para ter acesso ao núcleo a partir do citoplasma [44, 74].

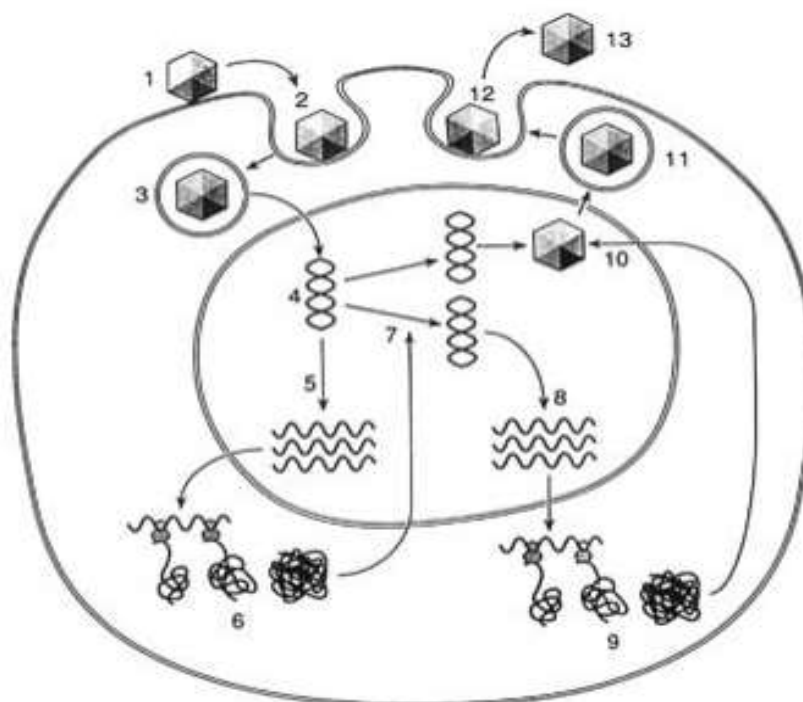
Quando o DNA viral atinge o núcleo dá-se início à replicação e à transcrição dos genes virais precoce e tardios [44, 73, 74]. Primeiramente são expressas as proteínas precoces e, só após estas, serão expressas as proteínas tardias, as VP1, VP2 e VP3, que têm uma importante função na construção da estrutura dos novos vírus [44, 74].

A replicação do DNA inicia-se pela ligação do T-Ag à origem da replicação [44]. O T-Ag é também um ativador do promotor viral da região tardia, auxiliando na finalização da transcrição viral após a replicação do DNA viral [44]. O T-Ag tem portanto uma importante função no ciclo de vida viral e na infeção da célula hospedeira [29, 44].

A montagem e libertação dos novos vírus ocorre após a expressão e consequente localização nuclear das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, que estão envolvidas na montagem da cápside, e que ainda se encontram no núcleo da célula hospedeira [44]. As proteínas associam-se para formar capsômeros, os quais se agregam em torno do DNA viral replicado, formando um nucleocapsídeo [74].

Após a saída das partículas virais do núcleo estas são envolvidas por endossomas, e para serem libertadas para o meio extracelular, fundem-se com a membrana celular da célula hospedeira (Figura 3) [18, 44, 74]. A montagem dos novos vírus e o lançamento destes para o espaço extracelular determina a conclusão do ciclo viral [44].

Admite-se que possam ocorrer duas formas de infeção viral pelo BKV dependendo da célula hospedeira [74]. Se o BKV infectar células permissivas a infeção viral ocorre de forma simples e rápida uma vez que, estas células permitem a replicação viral e favorecem a produção de novos vírus, designando-se por infeção lítica. Contudo, se o vírus infectar células hospedeiras, que não suportam a infeção lítica, o vírus promove a sua transformação celular para que a infeção viral seja possível [19, 75].



**Figura 3** - Representação esquemática do ciclo viral do BKV. (1) Ligação do vírus ao recetor da célula hospedeira. (2) Vírus é endocitado para o interior do hospedeiro. (3) Vírus é transportado até ao núcleo. (4) Exposição do genoma viral. (5) Expressão dos genes precoces. (6) Síntese das proteínas. (7 e 8) Duplicação do DNA viral e respetiva expressão. (9) Síntese de proteínas tardias. (10) Formação de novos vírus. (11) Libertação dos novos vírus do núcleo para o citoplasma da célula hospedeira. (12) Vírus conduzidos para o espaço extracelular. (13) Completam a infeção lítica. (adaptado de *Cole C. e colaboradores, 2001*) [74]

### 1.3.3 Modos de Transmissão e Manifestações Clínicas

As infeções causadas por vírus são uma parte integrante da vida humana, dado que, a maioria dos humanos estão persistentemente sujeitos a serem infetados com um ou mais vírus que podem ocasionalmente produzir patologias graves [34]. As principais limitações de estudos virais são o fato de que são tecnicamente difíceis de identificar e na maioria das vezes os sintomas que causam são inespecíficos, podendo passar despercebidos em muitas das situações [34].

Como foi referido anteriormente, a maioria das pessoas em todo o mundo estão infetadas com o BKV, no entanto raramente desenvolvem doença, exceto os indivíduos imunossuprimidos que podem desenvolver graves patologias [76].

As principais vias de transmissão do BKV são: a via oral, a via urinária e a via respiratória, podendo este vírus infectar células epiteliais e endoteliais de diversos órgãos [20, 51, 77]. As vias de transmissão deste vírus ainda não se encontram devidamente esclarecidas, no entanto, atualmente, têm sido discutidos outros potenciais modos de transmissão, que incluem as rotas placentárias, percutâneas, venérea e o contato pela pele [41, 51]. Tanto os indivíduos imunossuprimidos como os indivíduos saudáveis são importantes veículos para a transmissão e excreção deste vírus [41]. Segundo alguns autores, o BKV multiplica-se no local de entrada e segue para o tecido renal, onde permanece ao longo da vida do hospedeiro [78, 79].

O rim, nomeadamente as células do epitélio renal, são para o BKV o local privilegiado para a latência [14, 80]. Este vírus encontra-se presente em aproximadamente em 90% dos indivíduos saudáveis, no entanto podem também permanecer nos linfócitos B, glândulas salivares e nas células epiteliais da próstata [14, 80]. Foi também identificado no tecido cutâneo normal e com lesões, a partir de doentes com sarcoma de *Kaposi*, mas a pele, provavelmente não é o local responsável pela infecção primária causada por este vírus [20].

Os fatores que controlam o equilíbrio entre a latência e a reativação viral ainda não se encontram devidamente esclarecidos [81]. No entanto, sabe-se que as reativações não são só induzidas por uma imunossupressão como ocorre nos transplantes renais e de medula óssea, mas, também, por outros fatores, como gravidez, diabetes e outras doenças crónicas e envelhecimento [82-85].

O BKV tem sido associado a infeções do aparelho urinário tais como cistites hemorrágicas, estenoses uretrais e nefrites túbulo-intersticiais nos indivíduos transplantados renais e causa também cistite hemorrágica em recetores de transplante de medula óssea [20, 51, 72]. Este vírus está ainda associado a doenças do trato respiratório superior não específicas e ligeiras, no entanto, é menos comumente associado a pneumonia, retinite, doença hepática e meningoencefalite [14, 51, 86].

O aumento da frequência de transplantes e de doentes portadores de VIH, em todo o mundo, têm colocado BKV como um dos principais agentes patogénicos que merecem especial atenção, uma vez que se tornam reativos em uma significativa percentagem destes indivíduos [18, 60]. O diagnóstico precoce é essencial para o controlo da replicação do vírus e para que as consequências que poderá causar em indivíduos imunossuprimidos, que são portadores deste vírus, sejam menores [87]. Assim o estudo deste vírus constitui uma importante área de exploração atual e futura em indivíduos transplantados [87].

Atualmente, não existem tratamentos antivirais específicos para a infecção de BKV, embora existam procedimentos e fármacos que possam ser eficazes em alguns casos [46,



88]. A compreensão da biologia destes patógenos humanos seria extremamente relevante para garantir o desenvolvimento de medidas e terapias eficazes [44].

## 1.4 Caracterização Genotípica do BKV: Potencial Médico-Legal

O BKV é altamente prevalente na população mundial e sabe-se que os diferentes subtipos e subgrupos deste vírus apresentam uma distribuição geográfica desigual, no entanto admite-se que este vírus apresenta maior incidência na Europa, EUA e na Ásia o que pode estar correlacionado com a internacionalização dos seres humanos [29, 56].

Este vírus apresenta diferenças genotípicas que advêm das variações na sequência genômica codificante da proteína principal da cápside, a VP1, permitindo estas variações subdividir o BKV em subtipos e subgrupos [15, 29, 89].

O genoma da proteína VP1 é 95,8% comum ao genoma de todos os subtipos do BKV [15, 29, 89]. A restante percentagem diz respeito à existência de diferenças em determinadas posições nucleotídicas que permitem diferenciar e classificar o BKV em diferentes subtipos [15, 29, 89]. Essas variações são definidas como polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*), ou seja são as alterações num único nucleotídeo do genoma codificante da proteína principal que permitem distinguir os diferentes subtipos deste vírus (Tabela 1) [90].

O BKV apresenta, portanto, os subtipos I, II, III e IV distinguíveis pela reatividade imunológica e por técnicas de genotipagem a partir de amostras biológicas [15, 18, 51]. O subtipo I subdivide-se em quatro subgrupos adicionais, o Ia, o Ib-1, o Ib-2 e o Ic; cada um com um padrão geográfico específico [10, 11, 51, 55, 56]. Já o subtipo IV subdivide-se nos subgrupos: IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1 e IVc-2 [9, 70].

Atualmente, a distribuição geográfica dos diferentes subtipos e subgrupos do BKV tem sido descrita em vários estudos em países como a Inglaterra, a Tanzânia, os Estados Unidos da América (EUA) e o Japão [12, 55, 64, 89, 91, 92]. Este conhecimento permitiu definir um padrão geográfico de distribuição deste vírus no qual o subtipo I é o mais prevalente e difundido em todo o mundo seguindo-se o subtipo IV [18, 89, 92]. Já os subtipos II e III apresentam baixas taxas de frequência, no entanto, distribuem-se de forma desigual por todo o mundo [6, 9, 15, 18, 70]. Assim sendo, os genótipos do BKV que são geralmente identificados são os subtipos I e IV. Os subtipos II e III são raramente identificados [10, 11, 18, 55, 56, 89, 92].

Relativamente ao subtipo I, do BKV, pensa-se que pode ter tido origem em África e, em seguida, terá sido difundido por todo o mundo em consequência da migração da população humana [12, 93]. Diversos estudos vieram comprovar, que os subgrupos Ia, Ib-1, Ib-2, e Ic, são mais prevalentes na Europa (especialmente na Alemanha), na África, no Nordeste e Sudeste Asiático, com taxas de 75% (Ia na África) e de 100% (Ic em Nordeste da Ásia) [12, 64, 91]. O subgrupo Ia é, também, o mais prevalente na China, o subgrupo Ib-2 na Europa e no oeste da Ásia, e o Ic no nordeste da Ásia, incluindo o Japão [18, 70, 89, 91-93]. Sabe-se que o subgrupo Ib-2 é frequentemente identificado entre os europeus, ao passo que Ic é exclusivo para o Nordeste da Ásia [8].

Segundo um estudo realizado por *Zalona A.* e colaboradores, em 2011, o Ib -1 foi também frequentemente encontrado nos EUA, Europa, Japão, China e sudeste da Ásia [56]. Um estudo realizado por *Motazakker M.* e colaboradores, em 2012, veio comprovar também a prevalência do subtipo I numa população Iraniana [11]. Assim estudos sobre a distribuição geográfica dos subgrupos Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic revelam que a incidência é significativamente maior na Europa, na África e na Ásia [6, 91].

No que se refere ao subtipo IV do BKV foi definido como prevalente na Ásia, com exceção do Japão, no entanto, existem evidências da prevalência deste subtipo em outras regiões geográficas tais como na Europa e nos EUA [12, 18, 91, 93]. Não está, portanto claro como esta desigual distribuição geográfica do subtipo IV foi estabelecido, mas pensa-se que foram introduzidos há relativamente pouco tempo devido às deslocções regulares dos seres humanos da atualidade, podendo então o subtipo IV ter como origem a Ásia [12, 18, 91]. A frequência deste subtipo do BKV tem em algumas regiões (África, alguns países da Europa e na Ásia) diminuído, e pensa-se que possa ser devido a uma possível mudança na suscetibilidade dos hospedeiros [91].

A distribuição geográfica dos diferentes subtipos e subgrupos do BKV comprovam a elevada dispersão da população humana por todo o mundo e que cada país e/ou continente possui o seu padrão de distribuição [10, 11, 55, 56]. Num estudo realizado por *Ledesma J.* e colaboradores, em 2013, numa população de indivíduos espanhóis verificou-se a predominância dos subtipos I e II [94]. Já em Portugal, o padrão de distribuição dos subtipos BKV não é conhecido. Deste modo, pretende-se com este estudo, identificar os subtipos do BKV mais prevalentes de forma a contribuir para a caracterização da distribuição deste vírus em Portugal, com o intuito de futuramente o BKV poder ser utilizado como um marcador molecular da origem geográfica, podendo ser usado como uma ferramenta nas investigações forenses e criminais em situações de procura de identidade [37].

**Tabela 1** - Caraterização genotípica dos diferentes subtipos do BKV da posição 1716 à posição 1869 bp (adaptado de *Agostini H.* e colaboradores, 1995; *Tremolada S.* e colaboradores, 2010 e *Jin L.*, 1993) [29, 86, 95].

Posição	1716	1744	1746	1747	1760	1766	1767	1768	1769	1770	1775	1784	1787	1792	1793	1794	1809	1811	1824	1848	1851	1854	1857	1858	1860	1869
Subtipo I	C	G	A	A	T	T	A	A	A	G	G	A	A	A	G	C	G/ A/ C	G	C	C	C	C	T	T	A	C
Subtipo II	T	G	T	A	A	T	A	A	A	G	C	A	C	G	A	C	C	A	T	A	G	C	T	C	A	C
Subtipo III	T/ C	G	T	A	A	A	G	C	A	C	G	A	C	G	A	G	C	G	T	A	G	C	C	C	A	C
Subtipo IV	T/ C	A	T	G	A	T	A	A	G	A	C	C	C	G	A	G	C	G	C	A	A	T	T	T	G	T



## **2. Objetivos**



### **2.1 Objetivo Principal**

Deteção e caracterização genotípica do BKV, numa população portuguesa, e determinação da sua potencial aplicação na determinação geográfica individual.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Otimização do procedimento molecular para a deteção e caracterização genotípica do BKV por técnica de PCR-RFLP.
- Deteção do BKV em amostras de urina de indivíduos saudáveis e de indivíduos com cancro da próstata portugueses.
- Caracterização genotípica dos diferentes subtipos de BKV presentes na população em estudo.





### **3. Material e Métodos**





### **3.1 População em Estudo**

O estudo da detecção e caracterização genotípica do BKV realizou-se em dois grupos de participantes: 87 indivíduos saudáveis de Portugal continental e 155 indivíduos com diagnóstico histopatológico de cancro da próstata (CaP) da região norte de Portugal, com uma média de idade de 44,5 anos ( $\pm 15,9$  anos) e de 66,6 anos ( $\pm 8,9$  anos), respetivamente. Foi solicitada a todos os participantes uma amostra de urina, recolhida e acondicionada em recipientes esterilizados, após seu conhecimento e consentimento prévio, de acordo com a Declaração de Helsínquia.

### **3.2 Extração de DNA de Amostras Biológicas de Urina**

Após a recolha das amostras de urina, estas foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o *pellet* celular foi lavado com PBS 1X (*Phosphate buffered saline*) e este foi posteriormente centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos, à temperatura ambiente. No final o *pellet* celular obtido foi estabilizado em reagente *TripleXtractor® Isolation Reagent (GRISP®)* e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até extração/isolamento do material genético.

Para a extração de DNA das amostras de urina recorreu-se ao *kit* comercial de extração de ácidos nucleicos por um sistema de colunas de centrifugação, *GRS Genomic DNA Kit (Grisp®)*. Todo o procedimento laboratorial foi realizado em concordância com o descrito pelo fabricante deste *kit* e respeitando todas as suas recomendações. Este procedimento assenta, essencialmente, na grande afinidade do DNA à sílica, que está presente no revestimento das colunas de centrifugação sob a forma de membranas, permitindo assim a sua ligação. Para além de sílica, as colunas, possuem também resinas com partículas em suspensão alcoólica de elevadas concentrações de sais caotrópicos que são capazes de desnaturar proteínas e, desta forma, facilitar o acesso ao DNA. O procedimento é executado, essencialmente, em três fases: adsorção, lavagem e eluição. Para que a adsorção à membrana ocorra, isto é, para que ocorra a ligação do DNA às partículas de sílica, é imprescindível o baixo valor de pH. As lavagens, posteriores, são realizadas com vários tampões de etanol com o propósito de purificar o DNA, ou seja, remover proteínas, polissacarídeos e sais que possam causar problemas nas etapas

posteriores. O procedimento fica completo com a eluição do DNA num tampão de eluição, que contém uma baixa concentração salina.

Após a obtenção do DNA, a partir das amostras biológicas de urina, este foi avaliado quanto à sua concentração e à sua pureza, por meio da análise de densidade ótica com recurso ao espectrofotômetro *NanoDrop® ND- 1000*.

### 3.3 Deteção de DNA do BKV por *Polymerase Chain Reaction*

O fragmento de DNA pretendido foi amplificado através da técnica de PCR descrita por *Jin L.* em 1993, sendo definido posteriormente como PCR-BKV<sub>1</sub> [86]. A deteção do BKV foi realizada por amplificação de um fragmento de DNA com o tamanho de 327 bp, a partir de uma mistura de reação que compreendeu: 2 µL de DNA, 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase* (*Thermo Scientific®*) e o respetivo tampão de reação (*Thermo Scientific®*), 10 mM de dNTP *mix* (*Thermo Scientific®*) e 1,5 µL de cada *primer* (*primer forward* 5'CAAGTGCCAAACTACTAAT 3', *primer reverse* 5'TGCATGAAGGTTAAGCATGC 3') para um volume final de 50 µL.

As condições utilizadas para a amplificação foram: pré-desnaturação durante 2 minutos a 94°C para ativação da *Taq DNA Polymerase*, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 91°C durante 1 minuto, emparelhamento dos *primers* a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto; dispôs também de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos [86]. Em cada reação de PCR utilizou-se um controlo negativo e um controlo positivo. Cada amostra em estudo foi definida como, positiva para a presença do BKV, caso se verifica-se a presença do fragmento pretendido, com 327 bp, negativa na ausência desse fragmento e não conclusiva nas situações em que se observou inúmeras bandas inespecíficas, ou seja, fragmentação do DNA.

De forma a confirmar a amplificação do fragmento de DNA pretendido foram analisados 10 µL do produto de PCR com recurso a um gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). O brometo de etídeo é um corante que tem a capacidade de se intercalar com ao DNA e emitir fluorescência quando iluminado pela luz ultravioleta (UV) permitindo a visualização do fragmento pretendido caso esteja presente.

Os géis foram preparados com agarose e com tampão TBE 1X (*Tris/Borate/EDTA*), também utilizado como tampão de eletroforese. Recorreu-se ainda a um marcador

molecular de 50 bp (*Thermo Scientific®*). O fragmento de DNA foi visualizado na presença de luz UV recorrendo ao transiluminador *Gel DocXR* (*Biorad®*) (Figura 4) [86].



**Figura 4** - Gel de Agarose 1,5% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à região amplificada de 327 bp (1 - Marcador molecular de 50 bp; 2 - Controlo negativo; 3 - Controlo positivo para BKV; 4 - Caso positivo para o BKV; 5 a 7 - Casos negativos para o BKV).

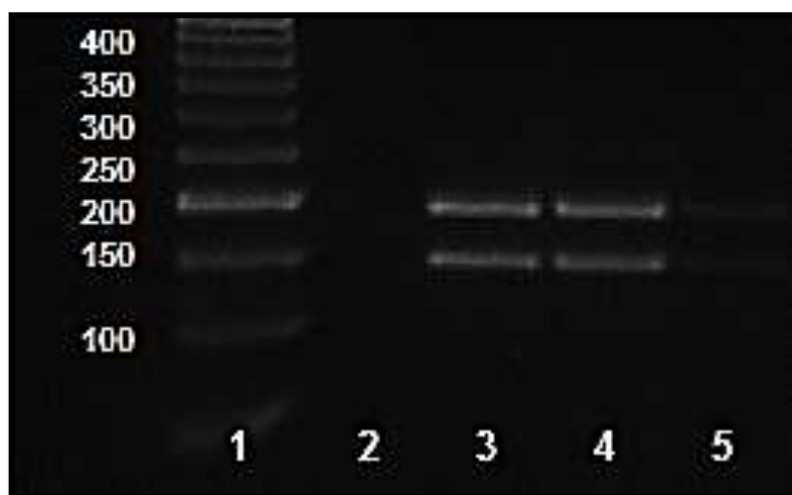
#### 3.4 Caraterização genotípica do BKV por *Restriction Fragment Length Polymorphism*

Para a identificação dos diferentes subtipos do BKV submeteu-se o produto amplificado à restrição enzimática, por técnica de RFLP, recorrendo-se à utilização de três diferentes enzimas de restrição: a *Alu I* (*Thermo Scientific®*), a *Xmn I* (*BioLabs®*) e a *Ava II* (*Thermo Scientific®*) [86]. O uso sequencial destas três enzimas de restrição permitiu, de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos, definir qual o subtipo do BKV presente em cada amostra positiva [86]. Na tabela 2 está descrito as diferentes enzimas de restrição aplicadas e o respetivo tamanho dos fragmentos obtidos, bem como a correspondência ao subtipo do BKV [86].

**Tabela 2** - Enzimas restrição e respetivo tamanho dos fragmentos com a correspondência ao subtipo do BKV (adaptado de Jin L., 1993) [86].

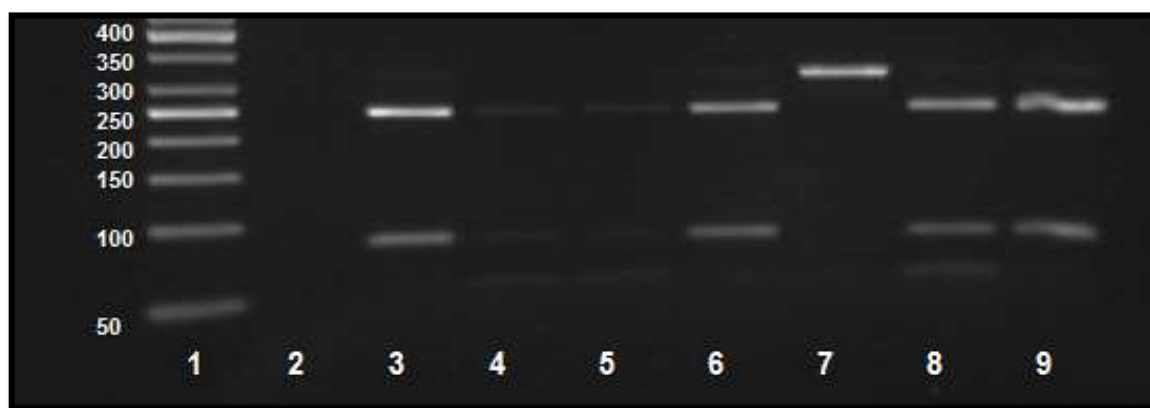
	Subtipo I	Subtipo II	Subtipo III	Subtipo IV
<b>Alu I</b>	186	186	327	327
	141	141	-	-
<b>Xmn I</b>	327	244	-	-
	-	83	-	-
<b>Ava II</b>	237	237	237	327
	90	90	90	-

A enzima de restrição Alu I (*Thermo Scientific*®) permite distinguir os casos positivos para o BKV em dois grupos: o subtipo I e II do subtipo III e IV. Para a digestão enzimática com esta enzima foram utilizadas 10 µL de produto de PCR de cada amostra positiva para o BKV e 2 unidades (U) de enzima de restrição Alu I (*Thermo Scientific*®) e o respetivo tampão de reacção, num volume final de reacção de 15 µL. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 3 horas. A presença de uma banda com 327 bp, o que significa que o fragmento não foi digerido pela enzima, indica que estamos na presença do subtipo III ou IV do BKV, já que estes subtipos não possuem local de clivagem para esta enzima [86]. A existência de duas bandas com 186 e 141bp indica a presença do subtipo I ou II deste vírus (Figura 5) [86].



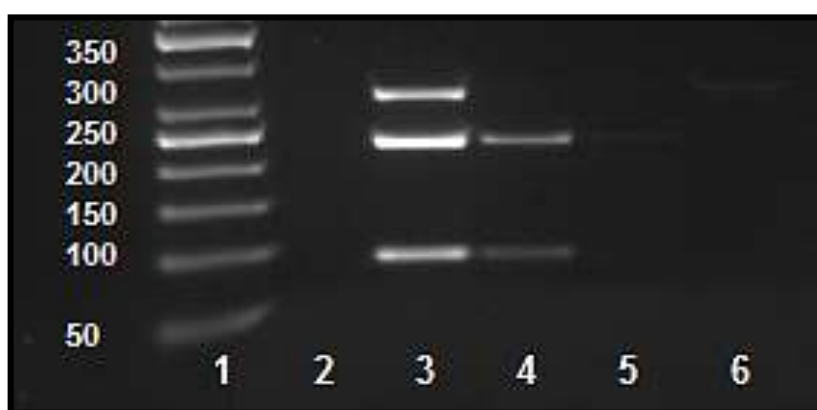
**Figura 5** - Gel de Agarose 3% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à digestão pela enzima de restrição Alu I (*Thermo Scientific*®) (1 - Marcador molecular de 50 bp; 2 - Controle negativo; 3 - Controle positivo do subtipo I ou II do BKV; 4 e 5 - Indivíduos com o subtipo I ou II do BKV).

A enzima de restrição Xmn I (*BioLabs*®) permite distinguir o subtipo I do subtipo II do BKV, não sendo portanto utilizada nos casos definidos como sendo do subtipo III ou IV. Para a digestão com esta enzima de restrição foram utilizadas 10 µL de produto de PCR de cada amostra positiva para o BKV, para a restrição com 1 U de enzima de restrição Xmn I (*BioLabs*®) e o respetivo tampão de reação, para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 2 horas. A presença de uma banda com 327 bp indica a presença do subtipo I do BKV. A existência de duas bandas com 244 e 83 bp indica a presença do subtipo II deste vírus (Figura 6) [86].



**Figura 6** - Gel de Agarose 3% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à digestão pela enzima de restrição Xmn I (*BioLabs*®) (1 - Marcador molecular de 50 bp; 2 - Controle negativo; 3 - Controle positivo do subtipo II do BKV; 4 a 6, 8 e 9 - Indivíduos com o subtipo II do BKV; 7 - Indivíduo com subtipo I do BKV).

A enzima de restrição Ava II (*Thermo Scientific*®) permite distinguir o subtipo III do subtipo IV do BKV. Para a digestão com esta enzima foram utilizadas 10 µL de produto de PCR de cada amostra positiva para o BKV, adicionados a 1 U de enzima de restrição Ava II (*Thermo Scientific*®) e o respetivo tampão de reação 10x, para um volume final de 20µL. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 2 horas. A presença de uma banda com 327 bp indica a presença do subtipo IV do BKV [86]. A existência de duas bandas, com 237 e 90 bp, respetivamente, indica a presença do subtipo III do BKV [86]. (Figura 7).



**Figura 7** - Gel de Agarose 3% (p/v) representativo com as bandas correspondentes à digestão pela enzima de restrição AVA II (*Thermo Scientific*®) (1 - Marcador molecular NZYDNA; 2 - Controle negativo; 3 - Controle positivo do subtipo III do BKV; 4 e 5 - Indivíduos com o subtipo III do BKV; 6 - Indivíduo com o subtipo IV do BKV).

Os produtos obtidos pela técnica de RFLP foram analisado com recurso a eletroforese em géis de agarose a 3% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). Os géis foram preparados com tampão TBE 1X (*Tris/Borate/EDTA*), também utilizado como tampão de eletroforese. Os fragmentos de DNA obtidos foram visualizados na presença de luz UV recorrendo ao transiluminador *Gel DocXR* (*Biorad*®).

A caracterização genotípica da população em estudo foi repetida em 10% dos indivíduos e os resultados foram analisados e confirmados por dois investigadores independentes.

### **3.5 Comparação de Método de Genotipagem do BKV**

A deteção do BKV foi também estudada de acordo com o procedimento descrito por *Kaydani G.* e colaboradores em 2015, definido posteriormente como PCR-BKV<sub>2</sub> [9]. Estes dois PCRs foram realizados de modo a comparar a amplificação de diferentes fragmentos genómicos do BKV, com o objetivo de determinar a região codificante do genoma mais útil a ser utilizada para o objetivo proposto. Deste modo, procedeu-se à caracterização de 30% da população em estudo pelo PCR-BKV<sub>2</sub>.

A mistura de reação para a deteção do BKV usada nesta segunda metodologia incluiu: 2 µL de DNA, 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*®) e o respetivo tampão de reação (*Thermo Scientific*®), 10 mM de dNTP *mix* (*Thermo Scientific*®) e 0,6 µL de cada *primer* (*primer forward*: 5'GCCTGCAGCAAGTGCCAAACTACTAAT 3', *primer reverse* 5'GCAAGCTTGCATGAAGGTTAAGCATGC 3') para um volume final de 50 µL. As condições utilizadas para a amplificação foram: pré-desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, emparelhamento de *primers* a 54°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto e meio; dispôs também de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos [9]. Em cada reação de PCR utilizou-se um controlo negativo e um controlo positivo para o BKV. Cada amostra em estudo foi definida como positiva para a presença do BKV, caso se verifica-se a presença do fragmento pretendido, com 342 bp, e negativa na ausência desse fragmento.

O produto obtido no PCR foi posteriormente analisado em eletroforese em géis de Agarose 1,5% (p/v) tal como está descrito na metodologia anterior [9].

Para a caracterização genotípica do BKV submeteu-se o produto amplificado à restrição enzimática com as três enzimas de restrição: a *Alu I* (*Thermo Scientific*®), a *Rsa I*



(*BioLabs*®) e a Cfr13 I (*Thermo Scientific*®) [9]. O uso sequencial destas três enzimas de restrição permitiu, definir de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos, qual o subtipo de BKV que cada amostra é portadora (Tabela 3) [9].

**Tabela 3** - Enzimas restrição e respetivo tamanho dos fragmentos com a correspondência ao subtipo o BKV (adaptado de *Kaydani G. e colaboradores, 2015*) [9].

	Subtipo I	Subtipo II	Subtipo III	Subtipo IV
<b>Alu I</b>	193	193	342	342
	149	149	-	-
<b>Cfr13 I</b>	245	245	245	342
	97	97	97	-
<b>Rsa I</b>	294	342	212	342
	48	-	130	-

### 3.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados com recurso ao *software* estatístico IBM® SPSS® *Statistics for Windows* (versão 23.0). A análise pelo teste do Qui-Quadrado (#2) foi utilizada para comparação das variáveis. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  e foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0.05. A probabilidade de ser diagnosticado com CaP associado à presença do BKV foi calculado através do *Odds Ratio* (OR) e respetivo intervalo de confiança a 95% (IC 95%).

Foram também analisados os parâmetros sensibilidade, especificidade e valores preditivos, a fim de analisar a validade dos protocolos utilizados no presente estudo. A sensibilidade foi definida como a capacidade do protocolo para identificar corretamente os indivíduos que são portadores do vírus. A especificidade foi definida como a capacidade do protocolo para identificar corretamente os indivíduos que não são portadores do vírus. Relativamente aos valores preditivos, o valor preditivo positivo representou a proporção de indivíduos verdadeiros positivos (isto é, portadores do vírus), entre todos aqueles que tiveram resultados positivos no teste, enquanto que o valor preditivo negativo representou

a proporção de indivíduos verdadeiros negativos (isto é, que não são portadores do vírus), entre todos aqueles que tiveram resultados negativos no teste.



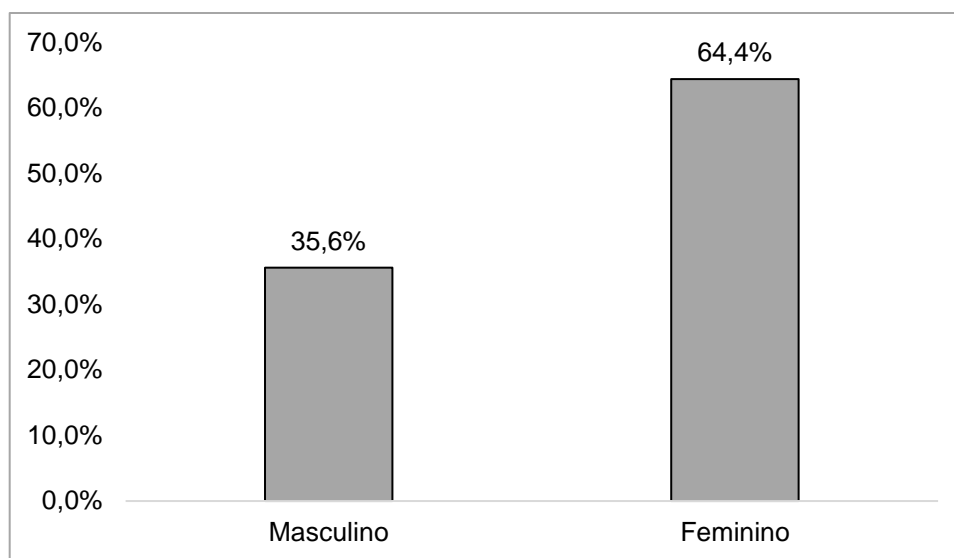


## **4. Resultados**



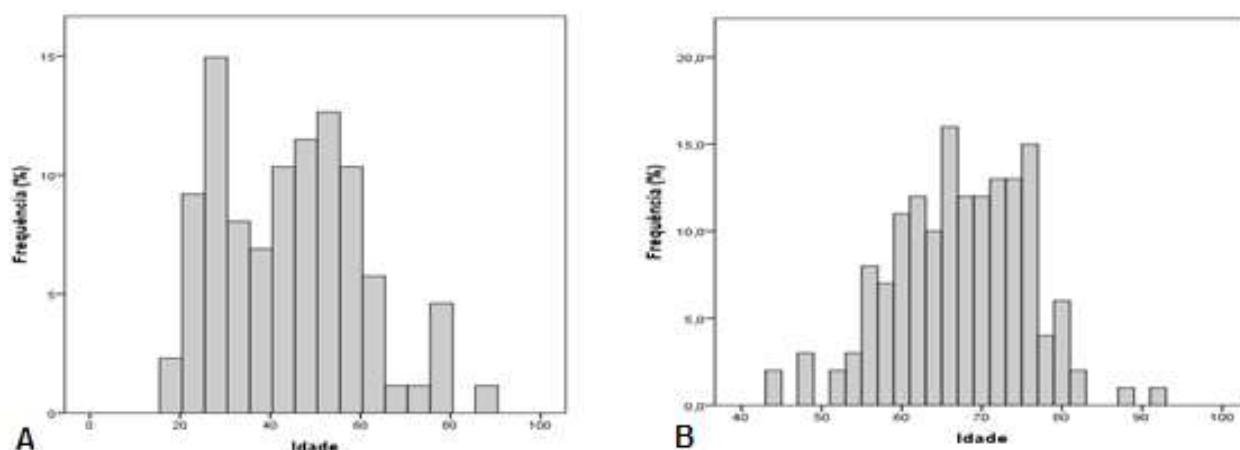
### 4.1 Deteção do BKV

Da população de indivíduos saudáveis englobados no estudo, 35,6% são do género masculino (31 indivíduos) e 64,4% são do género feminino (56 indivíduos) (Figura 8).



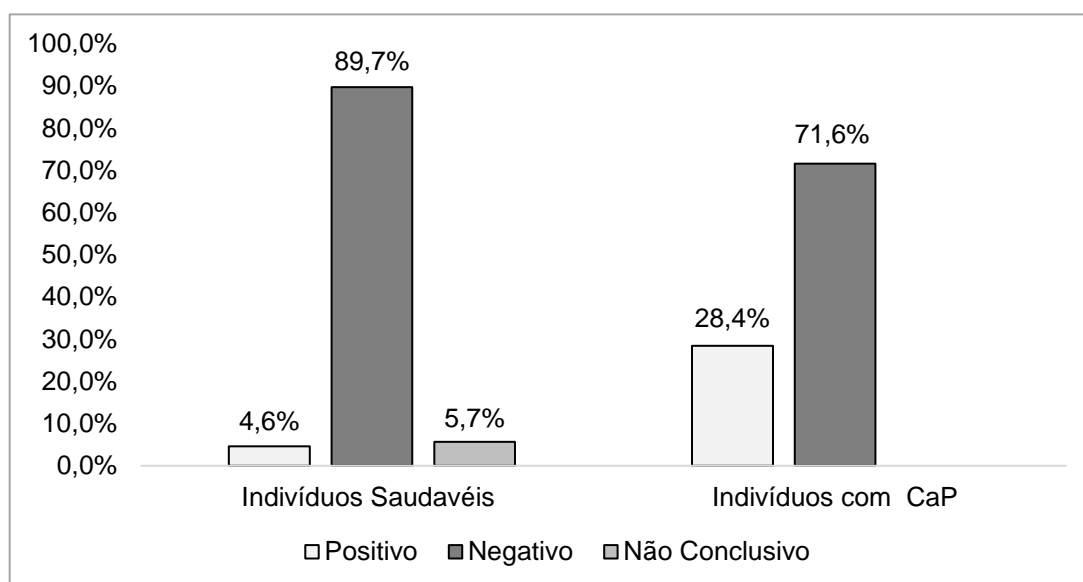
**Figura 8** - Distribuição da população de indivíduos saudáveis de acordo com o género.

Relativamente à variável idade na população de indivíduos saudáveis, a distribuição é heterogénea, verificando-se que 52% da população em estudo apresenta uma idade superior a 44 anos (Figura 9A). Na população de indivíduos com CaP, 19,6% dos indivíduos têm idade compreendida entre os 40-60 anos, 77,8% idade entre os 61-80 anos e apenas 2,6% apresenta idade superior a 81 anos (Figura 9B).



**Figura 9** - Distribuição da população em estudo de acordo com a idade (A - População de indivíduos saudáveis; B - População de indivíduos com CaP).

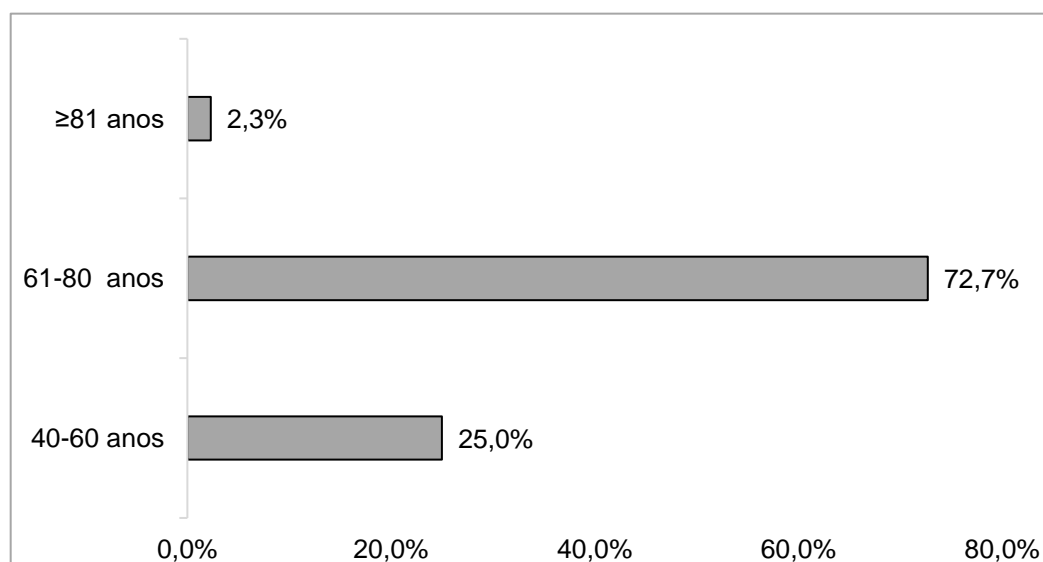
Na população em estudo foi detetada a presença do BKV em 4,6% (4 indivíduos) dos indivíduos saudáveis e em 28,4% (44 indivíduos) dos indivíduos com CaP. Na população de indivíduos saudáveis revelaram-se negativos para a presença do BKV 89,7% dos indivíduos (78 indivíduos) e em 71,6% dos indivíduos com CaP (111 indivíduos). A deteção do BKV foi considerada não conclusiva em 5,7% dos indivíduos saudáveis (5 indivíduos) (Figura 10).



**Figura 10** - Frequência do BKV na população de indivíduos saudáveis e de indivíduos com CaP de Portugal.

Relativamente ao género, no grupo de indivíduos saudáveis, positivos para a presença do BKV, verificou-se que 2 dos 4 casos pertencem ao género masculino e que os restantes 2 pertencem ao género feminino.

A frequência do BKV foi avaliada, também, em relação à idade estratificando-se a população em grupos distintos. Deste modo, na população de indivíduos saudáveis, verificou-se a existência de 1 indivíduo com idade inferior ou igual a 30 anos e também 1 indivíduo com idades entre 31 e os 50 anos, verificou-se ainda a existência de 2 indivíduos com idade igual ou superior a 51 anos. Quanto à população de indivíduos com CaP, 25,0% dos indivíduos (11 indivíduos) possuem idades entre os 40 e os 60 anos; 72,7% dos indivíduos (32 indivíduos) possuem idades entre os 61 e os 80 anos e 2,3% dos indivíduos (1 indivíduo) possuem idades iguais ou superiores a 81 anos (Figura 11).



**Figura 11** - Frequência dos casos positivos para o BKV na população de indivíduos com CaP de acordo com a idade.

Após deteção do BKV na população em estudo (indivíduos saudáveis vs indivíduos com CaP), observamos que os indivíduos positivos para o BKV apresentam uma maior probabilidade de apresentarem um diagnóstico de CaP (OR=5,75; IC 95%: 1,32- 25,12;  $p<0,011$ ) (Tabela 4).



**Tabela 4** - Frequência do BKV nos grupos de indivíduos em estudo, indivíduos saudáveis e indivíduos com CaP, num estudo de caso controlo.

	Indivíduos Saudáveis N (%) <sup>*</sup>	Indivíduos CaP N (%)	OR	IC 95%	p <sup>**</sup>
<b>BKV Negativo</b>	29 (93,5%)	111 (71,6%)	-	-	-
<b>BKV Positivo</b>	2 (6,5%)	44 (28,4%)	5,75	1,32 - 25,12	<0.011

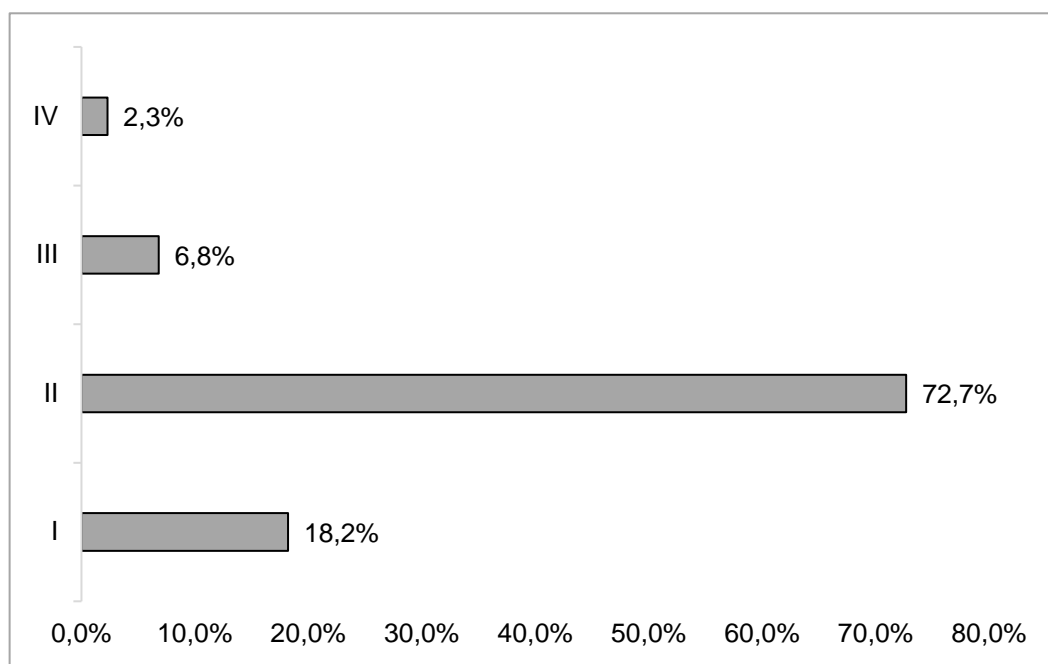
\* Em 5 Indivíduos saudáveis a deteção do BKV foi não conclusiva.

OR; *odds ratio*; IC 95%: intervalo confiança a 95%; P<sup>\*\*</sup> : teste  $\chi^2$ .

## 4.2 Caraterização Genotípica do BKV

Na população de indivíduos saudáveis o subtipo do BKV que foi identificado com maior frequência foi o subtipo III (2 indivíduos). Já os subtipos I e II foram identificados em 1 indivíduo, respetivamente. Quanto ao subtipo IV, não foi identificado em nenhum dos indivíduos desta população.

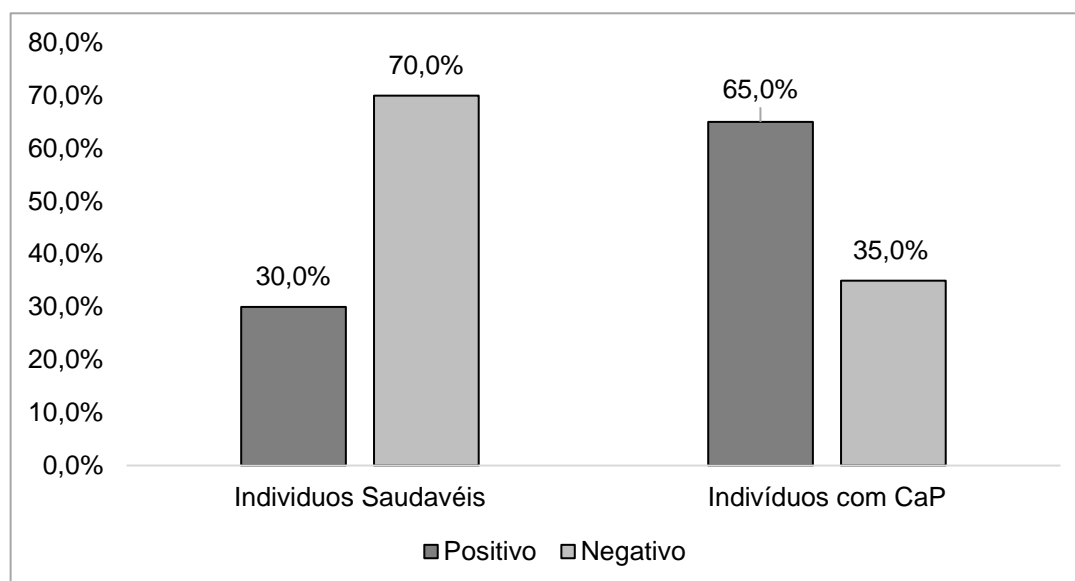
Em relação à população de indivíduos com CaP o subtipo do BKV com maior frequência foi o subtipo II, presente em 72,7% dos indivíduos (32 indivíduos), seguindo-se o subtipo I presente em 18,2% dos indivíduos (8 indivíduos), já o subtipo III surge em 6,8% dos indivíduos (3 indivíduos). O subtipo IV foi identificado apenas em 1 indivíduo, apresentando portanto uma frequência de 2,3% (Figura 12).



**Figura 12** - Distribuição dos diferentes subtipos do BKV na população de doentes com CaP de Portugal.

### 4.3 Comparação de Método de Genotipagem do BKV

Segundo o método PCR-BKV<sub>2</sub>, o BKV foi detetado em 30% dos indivíduos saudáveis (3 indivíduos) e em 65% dos indivíduos com CaP (39 indivíduos). Em 70% dos indivíduos saudáveis (7 indivíduos) e em 35% dos indivíduos com CaP (21 indivíduos) este vírus não foi detetado (Figura 13).



**Figura 13** - Frequência dos casos positivos e negativos para o BKV na população de indivíduos saudáveis e na população de indivíduos com CaP de Portugal.

Para avaliar a sensibilidade e especificidade na deteção do BKV foi realizada uma análise comparativa entre os dois PCRs utilizados, dirigidos a regiões genómicas do BKV distintas (Tabela 5).

**Tabela 5** - Distribuição dos casos positivos, negativos e não conclusivo para a deteção do BKV para cada método utilizado no presente estudo.

PCR-BKV <sub>1</sub>				
PCR-BKV <sub>2</sub>		Negativo	Positivo	Não Conclusivo
	Negativo	22	6	0
	Positivo	0	41	1
	Não Conclusivo	0	0	0

A sensibilidade de cada técnica foi calculada baseada no número de indivíduos com resultado positivo para o BKV, usando como referência o método definido como PCR-BKV<sub>1</sub>. Relativamente à especificidade de cada técnica, trata-se da capacidade de identificar os indivíduos com resultado negativo na população em estudo e que não possuem o BKV. Em ambos os parâmetros, os indivíduos portadores do BKV foram aqueles que

demonstram um resultado positivo para o BKV a quando da deteção do vírus pelo método definido como  $BKV_1$ , que foi considerada como método de referência. Desta forma, a percentagem de falsos negativos é o complemento da sensibilidade e a percentagem de falsos positivos é o complemento da especificidade (Tabela 6)

**Tabela 6** - Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos dos dois métodos aplicados no estudo.

	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo +	Valor Preditivo -
<b>PCR-BKV<sub>2</sub></b>	87,0%	100,0%	100,0%	79,0%
<b>PCR-BKV<sub>1</sub></b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tendo em conta os resultados obtidos, a sensibilidade é menor para a técnica definida por PCR-BKV<sub>2</sub> (87,0%) quando comparada com a técnica definida por PCR-BKV<sub>1</sub>. Cumulativamente a especificidade manteve-se igual para ambas as técnicas (100,0%).

Perante estes dados, o método definido por PCR-BKV<sub>1</sub> revelou-se a técnica mais sensível ao determinar os indivíduos que realmente estavam infetados com o BKV, não havendo portanto falsos positivos.

Foi ainda calculada a validade de cada método que diz respeito à amplitude com que ele pode prever a ocorrência da infeção pelo BKV. Desta forma, foram avaliados os valores preditivos positivo (VP+) e negativo (VP-) de acordo com cada método. Em relação ao valor preditivo positivo, isto é, diante de uma resposta positiva para a presença do BKV, o indivíduo que realmente está infetado pelo BKV, foram encontrados valores de 100% para o método definido como PCR-BKV<sub>1</sub> e para o método definido como PCR-BKV<sub>2</sub>. Assim, todos os indivíduos verdadeiramente positivos apresentaram um resultado positivo na fase de deteção em ambos os métodos. O valor preditivo positivo aumenta com a prevalência enquanto o valor preditivo negativo diminui. Assim, quando o vírus é raro o valor preditivo positivo é baixo, pois a maior parte dos testes positivos pertencem a indivíduos não infetados pelo vírus, representando resultados falsos positivos. Por outro lado, o valor preditivo positivo é alto em baixas prevalências.

Os resultados obtidos, no que se refere à caracterização genotípica, na população em estudo, mostraram-se concordantes em ambas as metodologias, com exceção de 13 indivíduos que foram definidos como não conclusivos no PCR-BKV<sub>2</sub> e que no PCR-BKV<sub>1</sub> foram identificados como sendo do subtipo II (11 indivíduos) e III (2 indivíduos) e de 1

indivíduo que foi definido como sendo do subtipo I no PCR-BKV<sub>2</sub>, e não foi possível caracteriza-lo no PCR-BKV<sub>1</sub>.



## **5. Discussão**



O poliomavírus humano BKV, isolado e caracterizado pela primeira vez em 1971, revelou-se um potencial marcador molecular útil na definição de padrões de distribuição geográfica individual devido à variabilidade genómica que apresenta, uma vez que atualmente, admite-se que diferenças genómicas do BKV estão associadas a regiões geográficas específicas [6, 7]. Esta particularidade torna-o uma útil ferramenta forense na procura de identidade de cadáveres ou restos cadavéricos não identificados, permitindo assim complementar a informação em casos de identificação individual [6, 7].

Na maioria dos casos, o primeiro contato do BKV com o ser humano ocorre na infância, sendo promovida a produção de anticorpos específicos pelo sistema imunológico do hospedeiro como forma de resposta [9]. No entanto, e apesar desta resposta imune, o vírus permanece latente ou com uma baixa taxa de expressão nos tecidos renais e urinários ao longo da vida do hospedeiro [9]. Esta característica torna possível a reativação do BKV principalmente quando os indivíduos ficam imunossuprimidos devido, por exemplo, a um transplante, mais concretamente os transplantes renais, a uma doença oncológica, nomeadamente o cancro da próstata, ou a infeções por outros vírus de que é exemplo o VIH [20, 80]. Nestes casos, estes indivíduos apresentam uma maior excreção do vírus relativamente a populações saudáveis [32, 69].

De acordo com os resultados obtidos, a frequência do BKV na população em estudo foi de 4,6% no grupo de indivíduos saudáveis e de 28,4% no grupo de indivíduos com CaP. Relativamente à população saudável, a frequência do BKV revelou-se concordante com um estudo prévio realizado em Portugal, por *Rodrigues C.* e colaboradores em 2007, em que a frequência do vírus foi de 1,8% [45]. A frequência encontrada é também semelhante à observada em outros países Europeus, como na Itália e em Espanha, em que se observam taxas de deteção do BKV de 3,8% e 13,6%, respetivamente [57, 96]. Em outros países, são detetadas taxas igualmente baixas comparativamente com este estudo, como é o caso da Sérvia com 4,6%, do Brasil com 7,2% e do Estado do Texas nos EUA com 7,4% [51, 66, 97]. Contrariamente ao observado na população portuguesa, em países como a República Checa e o Japão são encontradas frequências superiores da presença do BKV, sendo de 69,0% na República Checa e de 27,0% no Japão [98, 99].

Em relação à população de indivíduos com CaP, a frequência do BKV foi superior à população saudável, o que está de acordo com estudos prévios [29, 100-102]. Estudos desenvolvidos por *Balis V.* e colaboradores em 2007 e por *Delbue S.* e colaboradores em 2013 observaram a presença de BKV em 19,0% e 32,1% dos indivíduos com CaP, respetivamente [100, 101]. Também no Irão e EUA são observadas frequências de 30,1% e de 44,0% em indivíduos infetado com VIH [29, 102].



Relativamente à idade, nos indivíduos saudáveis o BKV é mais frequente em indivíduos com idade igual ou superior a 51 anos (2 indivíduos), os restantes dois indivíduos tinham idade igual ou inferior a 30 anos e idades entre 31-50 anos, respetivamente. No grupo de indivíduos com CaP verificou-se uma tendência para um aumento progressivo da frequência do BKV com a idade, exceto nos doentes com idade igual ou superior a 81 anos, sendo maior nos indivíduos com idades entre 61-81 anos (72,7%). Diferentes estudos têm revelado que existe, efetivamente, uma relação direta dos casos positivos para a presença do BKV com o aumento da idade até aproximadamente aos 60 anos, decrescendo nos anos seguintes. Esta tendência está provavelmente associada à diminuição da eficiência do sistema imunitário com o avançar da idade [66, 96, 99, 103-105].

Tal como referido anteriormente, os diferentes genótipos do BKV, definidos de acordo com diferenças genotípicas deste vírus, fazem deste um importante biomarcador molecular útil na definição de padrões de distribuição geográfica dos indivíduos, visto que, se distribuem de forma desigual por todo o mundo. Podendo a distribuição dos genótipos do BKV refletir uma divergência geográfica do hospedeiro ao longo dos anos [6, 9]. Na população de indivíduos saudáveis portugueses em estudo, o subtipo mais prevalente foi o subtipo III, seguindo-se o subtipo I e II. No grupo de indivíduos com CaP o subtipo dominante foi o II com 72,7%, seguindo-se o subtipo I com 18,2%, o subtipo III com 6,8% e o subtipo IV com 2,3%.

De acordo com a literatura, o subtipo I é o subtipo dominante em todas as regiões geográficas, seguido pelo subtipo IV e pelos subtipos II e III. Os subtipos II e III são raramente detetados, no entanto quando surgem apresentam baixas taxas nas populações europeias [10, 11, 18, 55, 56, 89, 92, 106]. Contrariamente a estes estudos, na nossa população o BKV mais frequente foi o subtipo II, tal poderá ser consequência do baixo número de indivíduos analisados ou poderá revelar um padrão epidemiológico da infeção por BKV diferente, sugerindo a ocorrência de diferentes padrões na Europa associados às diferentes dispersões das populações. Deste modo, torna-se relevante a replicação do presente estudo numa amostragem superior de indivíduos, de modo a definir claramente o padrão do BKV em países do Sul da Europa.

Comparando as duas metodologias, no que diz respeito à frequência do BKV, verificamos concordância na maioria dos resultados, exceto em seis indivíduos definidos como positivos segundo a metodologia PCR-BKV<sub>1</sub> e que se mostraram negativos pela metodologia PCR-BKV<sub>2</sub>, e ainda 1 indivíduo que na metodologia PCR-BKV<sub>1</sub> não foi conclusivo mas que na metodologia PCR-BKV<sub>2</sub> revelou-se positivo. A principal diferença entre as duas técnicas realizadas é o fragmento genómico do BKV amplificado, o que sugere que a região amplificada pelo PCR-BKV<sub>1</sub> poderá ser uma região mais conservada

e assim essa estabilidade traduzir-se-á numa melhor eficácia de ligação dos *primers* e consequentemente num maior sucesso de amplificação do fragmento. Em termos de caracterização genotípica, os resultados obtidos, também se revelaram concordantes, exceto em 13 indivíduos que não foi possível determinar genótipo do BKV na metodologia definida por PCR-BKV<sub>2</sub> tendo sido caracterizados como sendo do subtipo II ou III pela metodologia PCR-BKV<sub>1</sub>. Desde modo, admiti-mos que a caracterização do BKV pela técnica PCR-BKV<sub>1</sub>, desenvolvida por *Jin L.* em 1993, ao amplificar e usar para genotipagem uma região mais conservada da região codificante da proteína VP1 é mais adequada e menos suscetível de sofrer modificações com implicações para a técnica desenvolvida.

Este estudo suportou a utilização do BKV como um novo marcador molecular, usado no futuro como uma ferramenta adicional na investigação forense, nomeadamente no estabelecimento da origem geográfica de cadáveres ou restos cadavéricos não identificados. Adicionalmente, o BKV também se revelou um possível marcador de patologia, nomeadamente doença oncológica, o que também poderá ser útil no âmbito médico-legal, permitindo a obtenção de mais dados informativos em complexos casos de identificação. O seu elevado potencial de aplicabilidade em medicina legal, aliado à utilização de amostras biológicas de fácil colheita e a técnicas de biologia molecular de elevada sensibilidade e especificidade, tornam a aplicação da genotipagem do BKV promissora e exequível no âmbito forense.





## **6. Conclusão e Perspetivas Futuras**



Ao longo dos últimos anos, a medicina legal tem demonstrado a existência de diversos problemas na identificação de cadáveres, uma vez que, tem-se verificado um aumento das internacionalizações e da atividade criminosa. Desta forma, o desenvolvimento de métodos de deteção e caracterização genotípica de vírus humanos que se distribuem de forma desigual por todo mundo constitui um método por excelência para auxiliar na procura da identidade, fornecendo também importantes dados para estudos de base populacional. Atualmente, admite-se que o estudo da variabilidade do BKV pode ser uma ferramenta útil neste campo, uma vez que a ocorrência de diferentes subtipos de BKV tem sido associada a diferentes regiões geográficas, e ao facto de ser uma infecção frequentemente adquirida durante a infância.

Neste estudo, o BKV foi detetado em 4,6% dos indivíduos saudáveis e em 28,4% dos indivíduos com CaP. Aparentemente, esta maior frequência em indivíduos doentes poderá ser consequência de uma maior imunossupressão, associada à patologia, que permitirá a reativação viral e consequente aumento da taxa de excreção. A imunossupressão, também característica do envelhecimento, permite-nos compreender o aumento da frequência do BKV nos indivíduos com maior idade, facto também verificado neste estudo.

Relativamente à caracterização genotípica do BKV, observamos que os subtipos mais comuns são o I e II do BKV. Os subtipos III e IV foram identificados em proporções significativamente inferiores.

No que respeita às metodologias aplicadas, podemos concluir que o método descrito por *Jin L.* em 1993, é o mais sensível na identificação da presença do BKV, amplificando uma região do BKV com maior potencial para ser submetida a restrição enzimática.

Como trabalho futuro seria relevante alargar o número de participantes no estudo, de modo a validar o padrão de genótipos do BKV encontrado na população portuguesa e estabelecer com maior precisão o padrão epidemiológico de distribuição do BKV no Sul da Europa. Adicionalmente será relevante clarificar a associação da presença do BKV a diferentes patologias, nomeadamente outros tipos de cancro.

Os resultados obtidos neste estudo bem como as características do BKV, revelaram que a sua utilização, como um novo marcador molecular, é uma importante ferramenta adicional na investigação forense, nomeadamente no estabelecimento da origem geográfica de cadáveres ou restos cadavéricos não identificados. Adicionalmente, o BKV também se revelou como um possível marcador de patologia, nomeadamente doença oncológica, o que poderá adicionar informações úteis para a resolução de complexos casos de identificação no âmbito médico-legal.

O elevado potencial de aplicabilidade do estudo da variabilidade do BKV em medicina legal, como uma ferramenta adicional para a identificação, aliado à utilização de amostras biológicas de fácil acesso e colheita, bem como a elevada sensibilidade e especificidade das técnicas de biologia molecular aplicadas, tornam a sua aplicação promissora e viável em investigações forenses.



## **7. Referências Bibliográficas**





1. Kahana, T. and J. Hiss, *Identification of human remains: forensic radiology*. J Clin Forensic Med, 1997. **4**(1): p. 7-15.
2. Carvalho, M., et al., *Use of images for human identification in forensic dentistry\**. Radiologia Brasileira, 2009. **42**(2): p. 125-130.
3. Scheuer, L., *Application of osteology to forensic medicine*. Clin Anat, 2002. **15**(4): p. 297-312.
4. Cattaneo, C., et al., *Unidentified cadavers and human remains in the ECU: an unknown issue*. The Newsletter of the International Academy of Legal Medicine, 2000. **113**(3): p. 1-200.
5. Avon, S.L., *Forensic odontology: the roles and responsibilities of the dentist*. J Can Dent Assoc, 2004. **70**(7): p. 453-8.
6. Ikegaya, H., *Geographical identification of cadavers by human parasites*. Forensic Sci Int Genet, 2008. **2**(2): p. 83-90.
7. Ikegaya, H., et al., *BK virus genotype distribution offers information of tracing the geographical origins of unidentified cadaver*. Forensic Sci Int, 2007. **173**(1): p. 41-6.
8. Ikegaya, H., et al., *JC virus genotyping offers a new means of tracing the origins of unidentified cadavers*. Int J Legal Med, 2002. **116**(4): p. 242-5.
9. Kaydani, G.A., et al., *Prevalence and Distribution of BK virus Subtypes in Renal Transplant Recipients Referred to Golestan Hospital in Ahvaz, Iran*. Jundishapur J Microbiol, 2015. **8**(3): p. e16738.
10. Krumbholz, A., et al., *Evolution of four BK virus subtypes*. Infect Genet Evol, 2008. **8**(5): p. 632-43.
11. Motazakker, M., M. Bagheri, and M. Imani, *Subtyping of BK Virus in Iranian Turkish Renal Transplant Recipients by RFLP-PCR*. Maedica (Buchar), 2012. **7**(1): p. 10-3.
12. Chen, Q., et al., *Subtype IV of the BK polyomavirus is prevalent in East Asia*. Archives Virology, 2006. **151**: p. 2419–2429.
13. Jin, L., et al., *Prevalence and distribution of BK virus subtypes in healthy people and immunocompromised patients detected by PCR-restriction enzyme analysis*. Clin Diagn Virol, 1995. **3**(3): p. 285-95.
14. Pinto, M. and S. Dobson, *BK and JC virus: a review*. J Infect, 2014. **68 Suppl 1**: p. S2-8.
15. Nishimoto, Y., et al., *Evolution of BK virus based on complete genome data*. J Mol Evol, 2006. **63**(3): p. 341-52.
16. Cherry, J., et al., *DNA Viruses subsection 2 Polyomaviridae*, in *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 2014, Expert Consult. p. 1863-1874.

17. John, R., et al., *Taxonomical developments in the family Polyomaviridae*. Arch Virol, 2011. **156**(9): p. 1627-34.
18. Krumbholz, A., et al., *Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(5): p. 784-99.
19. Neu, U., T. Stehle, and W.J. Atwood, *The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry*. ELSEVIER 2009. **384**: p. 389-399.
20. Moens, U. and M. Johannessen, *Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire*. J Dtsch Dermatol Ges, 2008. **6**(9): p. 704-8.
21. Gross, L., *Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 xg), Ak-leukemic extracts*. Cancer, 1953. **6**(5): p. 948-957.
22. Gross, L., *A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **83**(2): p. 414-21.
23. Stewart, S.E., B.E. Eddy, and N. Borgese, *Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture*. J Natl Cancer Inst, 1958. **20**(6): p. 1223-43.
24. Eddy, B.E. and S.E. Stewart, *Characteristics of the SE polyoma virus*. Am J Public Health Nations Health, 1959. **49**: p. 1486-92.
25. Rabson, A.S. and R.L. Kirschstein, *Induction of malignancy in vitro in newborn hamster kidney tissue infected with simian vacuolating virus (SV40)*. Proc Soc Exp Biol Med, 1962. **111**: p. 323-8.
26. Gardner, S.D., et al., *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, 1971. **1**(7712): p. 1253-7.
27. Padgett, B.L. and D.L. Walker, *Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy*. J Infect Dis, 1973. **127**(4): p. 467-70.
28. Frisque, R.J., G.L. Bream, and M.T. Cannella, *Human polyomavirus JC virus genome*. J Virol, 1984. **51**(2): p. 458-69.
29. Agostini, H.T., et al., *BK virus and a new type of JC virus excreted by HIV-1 positive patients in rural Tanzania*. Arch Virol, 1995. **140**(11): p. 1919-34.
30. Van der Meijden, E., et al., *Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001024.
31. Mes, T.H.M., G.J.J. Doornum, and M. Schutten, *Population genetic tests suggest that the epidemiology of JCV and BKV are strikingly different*. Elsevier, 2010. **10**: p. 397-403.

32. Stoner, G.L. and R. Hübner, *The Human Polyomaviruses: Past, Present, and Future*, in *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives* K.K.a.S.G. L., Editor. 2001. p. 611-663.
33. Chang, H., et al., *High incidence of JC viruria in JC-seropositive older individuals*. J Neurovirol, 2002. **8**(5): p. 447-51.
34. Allander, T., et al., *Identification of a third human polyomavirus*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 4130-6.
35. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1096-100.
36. Fields, B.N., et al., *Polyomaviridae: The Viruses and Their Replication*, in *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Editor. 1996. p. 2141-2174.
37. Yogo, Y., et al., *Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications*. Rev Med Virol, 2009. **19**(4): p. 185-99.
38. Buck, C.B., et al., *Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus*. J Virol, 2012. **86**(19): p. 10887.
39. Fang, C.Y., et al., *Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS*. Virology, 2010. **402**(1): p. 164-76.
40. Scuda, N., et al., *A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4586-90.
41. Schowalter, R.M., et al., *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(6): p. 509-15.
42. Rockett, R.J., et al., *Detection of novel polyomaviruses, TSPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and MWPyV in feces, urine, blood, respiratory swabs and cerebrospinal fluid*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62764.
43. Yu, G., et al., *Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49449.
44. Eash, S., et al., *The Human Polyomaviruses*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006. **63**: p. 865-876.
45. Rodrigues, C., D. Pinto, and R. Medeiros, *Molecular Epidemiology Characterization of the Urinary Excretion of Polyomavirus in Healthy Individuals From Portugal—A Southern European Population*. Journal of Medical Virology, 2007. **79**: p. 1194-1198.
46. Long, S.S., L.K. Pickering, and C.G. Prober, *BK, JC, and Other Human Polyomaviruses*, in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, ELSEVIER, Editor. 2012. p. 1075-1081.

47. Fioriti, D., et al., *The human polyomavirus BK: Potential role in cancer*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 402-6.
48. Antonsson, A., et al., *Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 7): p. 1849-53.
49. Polz, D., A. Stec, and M. Polz-Dacewicz, *BK-virus (BKV) – structure, epidemiology and pathogenesis*. Pre-Clinical and Clinical Research, 2013. **7**(2): p. 90-92.
50. Hirsch, H.H. and J. Steiger, *Polyomavirus BK*. THE LANCET Infectious Diseases, 2003. **3**(10): p. 611-623.
51. Karalic, D., et al., *The prevalence of Human Polyomaviruses in urine samples of immunocompetent individuals in the Serbian population*. Archives of Biological Sciences, 2012. **64**(4): p. 1383-1388.
52. Hayashi, H., et al., *JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma*. Neuropathology, 2001. **21**(2): p. 129-137.
53. Krynska, B., et al., *Detection of human neurotropic JC virus DNA sequence and expression of the viral oncogenic protein in pediatric medulloblastomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11519-24.
54. Bollag, B., W.F. Chuke, and R.J. Frisque, *Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 863-72.
55. Krumbholz, A., et al., *Prevalence of BK virus subtype I in Germany*. J Med Virol, 2006. **78**(12): p. 1588-98.
56. Zalona, A.C., et al., *Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil*. J Med Virol, 2011. **83**(8): p. 1401-5.
57. Di Taranto, C., et al., *Detection of BK polyomavirus genotypes in healthy and HIV-positive children*. Eur J Epidemiol, 1997. **13**(6): p. 653-7.
58. Boothpur, R. and D.C. Brennan, *Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC*. J Clin Virol, 2010. **47**(4): p. 306-12.
59. Knowles, W.A., *Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV)*. Adv Exp Med Biol, 2006. **577**: p. 19-45.
60. Dall, A. and S. Hariharan, *BK virus nephritis after renal transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 2**: p. S68-75.
61. Hariharan, S., *BK virus nephritis after renal transplantation*. Kidney Int, 2006. **69**(4): p. 655-62.
62. Gardner, S.D., *Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.k.)*. Br Med J, 1973. **1**(5845): p. 77-8.

63. Rennert, H., et al., *Evaluation of a BK virus viral load assay using the QIAGEN Artus BK Virus RG PCR test*. Elsevier, 2012. **54**: p. 260-264.
64. Baksh, F.K., et al., *Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(2): p. 354-65.
65. Randhawa, P., et al., *BK virus: discovery, epidemiology, and biology*. Graft, 2002. **5**(suppl 1): p. S19.
66. Robaina, T.F., et al., *Shedding of polyomavirus in the saliva of immunocompetent individuals*. J Med Virol, 2013. **85**(1): p. 144-8.
67. Delbue, S., P. Ferrante, and M. Provenzano, *Polyomavirus BK and prostate cancer: an unworthy scientific effort?* Oncoscience, 2014. **1**(4): p. 296-303.
68. Doerries, K., *Human polyomavirus JC and BK persistent infection*. Adv Exp Med Biol, 2006. **577**: p. 102-16.
69. Doerries, K., *Latet and persistent polyomavirus infection.*, in *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*, K.K.a.G.L. Stoner, Editor. 2001, Wiley-Liss: New York. p. 197-235.
70. Zhong, S., et al., *Comparison of the distribution patterns of BK polyomavirus lineages among China, Korea and Japan: Implications for human migrations in northeast Asia*. Microbiol Immunol, 2009. **53**: p. 266-276.
71. Seif, I., G. Khoury, and R. Dhar, *The genome of human papovavirus BKV*. Cell, 1979. **18**(4): p. 963-77.
72. Moriyama, T. and A. Sorokin, *BK virus (BKV): infection, propagation, quantitation, purification, labeling, and analysis of cell entry*. Curr Protoc Cell Biol, 2009. **Chapter 26**: p. Unit 26 2.
73. Dugan, A.S., et al., *Identification of Amino Acid Residues in BK Virus VP1 That Are Critical for Viability and Growth*. JOURNAL OF VIROLOGY, 2007. **81**(21): p. 11798–11808.
74. Cole, C.M. and S.M. Conzen, *Polyomaviridae: the viruses and their replication.*, in *Field Virology 4<sup>th</sup> Edition*, D.M.H.P.M. KNIpe, Editor. 2001, Lippincott Williams and Wilkens: Philadelphia. p. 2141-2147.
75. Egli, A., et al., *Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors*. J Infect Dis, 2009. **199**(6): p. 837-46.
76. Staff. *BK virus infection in kidney transplant recipients increases risk of developing donor-specific antibodies*. 2014; Available from: <http://www.nephrologynews.com/bk-virus-infection-in-kidney-transplant-recipients-increases-risk-of-developing-donor-specific-antibodies/>.

77. Fishman, J.A., *BK virus nephropathy--polyomavirus adding insult to injury*. N Engl J Med, 2002. **347**(7): p. 527-30.
78. Heritage, J., P.M. Chesters, and D.J. McCance, *The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue*. J Med Virol, 1981. **8**(2): p. 143-50.
79. McCance, D.J., *Persistence of animal and human papovaviruses in renal and nervous tissues*. Prog Clin Biol Res, 1983. **105**: p. 343-57.
80. Reploeg, M.D., G.A. Storch, and D.B. Clifford, *Bk virus: a clinical review*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(2): p. 191-202.
81. Hogan, T.F., et al., *Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients*. Ann Intern Med, 1980. **92**(3): p. 373-8.
82. Arthur, R.R., et al., *Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants*. N Engl J Med, 1986. **315**(4): p. 230-4.
83. Tajima, M., et al., *[Prevalence of the antibody against human polyoma viruses (JCV and BKV) in aged persons]*. Kansenshogaku Zasshi, 1990. **64**(12): p. 1507-13.
84. Taguchi, F., et al., *Transplacental transmission of BK virus in human*. Jpn J Microbiol, 1975. **19**(5): p. 395-8.
85. Kling, C.L., et al., *Dynamics of urinary polyomavirus shedding in healthy adult women*. J Med Virol, 2012. **84**(9): p. 1459-63.
86. Jin, L., *Rapid genomic typing of BK virus directly from clinical specimens*. Mol Cell Probes, 1993. **7**(4): p. 331-4.
87. Khalili, K. and G.L. Stoner, *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. The Human Polyomaviruses: Past, Present, and Future, ed. K.K.a.S.G. L. Vol. ch22. 2001, New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
88. Cohen, J., W.G. Powderly, and S.M. Opal, *Polyomaviruses*, in *Infectious Diseases*, E.-H.S. Division, Editor. 2010: Canada. p. 1644-1647.
89. Takasaka, T., et al., *Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region*. Journal of General Virology 2004. **85**(10): p. 2821-2827.
90. Sobrino, B., M. Brion, and A. Carracedo, *SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies*. Forensic Sci Int, 2005. **154**(2-3): p. 181-94.
91. Zheng, H., et al., *Relationships between BK virus lineages and human populations*. ELSEVIER, 2007. **9**(2): p. 204-213.
92. Ikegaya, H., et al., *Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 11): p. 3201-8.

93. Chehadeh, W. and M.R. Nampoory, *Genotypic Diversity of Polyomaviruses Circulating Among Kidney Transplant Recipients in Kuwait*. Journal of Medical Virology, 2013: p. 1-8.
94. Ledesma, J., et al., *BK Polyomavirus Genotyping at Inter- and Intra-Patient Level in Spain*. Journal of Medical Virology, 2013. **85**: p. 1402–1408.
95. Tremolada, S., et al., *Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency*. Virus Research, 2010. **149**(2): p. 190-196.
96. Polo, C., et al., *Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(7): p. 640-4.
97. Vanchiere, J.A., et al., *Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(8): p. 2388-91.
98. Sroller, V., et al., *Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population*. J Med Virol, 2014. **86**(9): p. 1560-8.
99. Zhong, S., et al., *Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 193-8.
100. Balis, V., et al., *Prevalence of BK virus and human papillomavirus in human prostate cancer*. Int J Biol Markers, 2007. **22**(4): p. 245-51.
101. Delbue, S., et al., *Evidence supporting the association of polyomavirus BK genome with prostate cancer*. Med Microbiol Immunol, 2013. **202**(6): p. 425-30.
102. Behzad-Behbahani, A., et al., *Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation*. Journal of Clinical Virology, 2004. **29**(4): p. 224-229.
103. Kitamura, T., et al., *High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients*. J Infect Dis, 1990. **161**(6): p. 1128-33.
104. Knowles, W.A., et al., *Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40*. J Med Virol, 2003. **71**(1): p. 115-23.
105. Flaegstad, T., et al., *Prevalence of anti BK virus antibody in Portugal and Norway*. Scand J Infect Dis, 1989. **21**(2): p. 145-7.
106. Ledesma, J., et al., *BK polyomavirus genotyping at inter- and intra-patient level in Spain*. Journal of Medical Virology, 2013. **85**: p. 1402–1408.



